



Centro de
Investigaciones Nucleares
Facultad de Ciencias



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



**PROGRAMA DE MAESTRÍAS Y DOCTORADOS EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS
PRO.IN.BIO.**

ESCUELA DE GRADUADOS-FACULTAD DE MEDICINA

**“Desarrollo de formulaciones
nanoestructuradas portadoras de
fenazinas para su aplicación en
oncología”**



MSc. Nicole Lecot

Directores de Tesis: Dra. Mercedes González, Dra. Romina Glisoni y Dr. Pablo Cabral

Noviembre 2019

Resumen

Propósito de la investigación: 5,10-Dióxido de 2-amino-7(8)-fluorofenazina (FNZ) es un profármaco biorreducible en condiciones de hipoxia, poco soluble en agua, con potencial actividad anticancerígena sobre tumores hipóxicos. Esta pobre solubilidad en medios biológicos, limitaría la aplicación de FNZ en la clínica. Las micelas poliméricas prístinas anfifílicas (MPs) a base de copolímeros tribloque PEO-PPO-PEO, Pluronic® y Tetronic®, sus derivados glicosilados con restos gluconolactonas (Glu) y sus respectivas mezclas con liposomas preformados (LPS), son un grupo novedoso de sistemas nanoestructurados inteligentes y termosensibles que pueden ser utilizados para mejorar la solubilidad, la biodisponibilidad y la permeación de profármacos bio reducibles poco solubles, como FNZ.

Métodos: FNZ se encapsuló en MPs y mezclas de MPs con LPS. La caracterización de las nanoestructuras resultantes se realizó mediante espectroscopía UV-visible (UV-VIS), microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopía de fuerza atómica (AFM). Asimismo, se seleccionaron las nanoformulaciones más promisorias, en cuanto a las

propiedades desplegadas por estas, y se procedió al estudio farmacológico en un modelo de tumor de mama metastásico murino símil fase IV humano (4T1). Estos ensayos fueron realizados a dos dosis del profármaco biorreducible FNZ, de 20 y 200 mg/kg de ratón BALB/c. Finalmente, se procedió al marcado con ^{99m}Tc de una de las MPs y del profármaco FNZ para su seguimiento *in vivo* en el antedicho modelo de cáncer de mama metastásico.

Resultados: Los resultados revelaron que la solubilidad del profármaco FNZ encapsulado se incrementó hasta diez veces, respecto a su solubilidad intrínseca en agua. Los resultados analizados por UV-VIS, DLS, MET y AFM confirmaron la interacción de FNZ con MPs, MPs derivatizadas y MPs en mezclas con LPS, y en todos los casos desplegaron apropiadas eficiencias de encapsulación, tamaños de partícula monodispersos, adecuada estabilidad y morfología del tipo esférica. Además, el perfil *in vitro* de liberación controlada de FNZ, desde todos los sistemas preparados, se ajustó a una cinética que sigue el Modelo de Higuchi, con un mecanismo principal de liberación mediada por la difusión del fármaco y la relajación de las cadenas poliméricas, a medida que el medio de liberación difunde a través del material polimérico.

Por último, se logró inhibiciones del tamaño tumoral de hasta un 54%, con mínimos signos de afectación del animal a las concentraciones ensayadas de profármaco.

Conclusión: Se diseñaron y desarrollaron nanosistemas portadores de FNZ, un profármaco biorreducible poco soluble en agua, los cuales mostraron desplegarse como potenciales agentes de terapia contra el cáncer de mama.

Agradecimientos

A mi tutora Dr. Mercedes González por haberme abierto las puertas para dedicarme completamente a la vida académica, introducirme en ésta área de investigación y compartir sus conocimientos en el desarrollo de fármacos. Gracias por haberme apoyado en varias instancias como el desarrollo de mi trabajo de posgrado, presentación a becas nacionales y movilidades al exterior.

A mi tutora Dr. Romina Glisoni, por su apoyo y amistad. Por todos los momentos vividos de crecimiento personal y profesional. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio, por compartir toda tu experiencia y conocimiento en el desarrollo y caracterización de nanoestructuras. Sin dudas un gran apoyo en esta tesis desde la distancia y la cercanía compartiendo momentos de felicidad.

A mi tutor Dr. Pablo Cabral por haber formado parte de todo mi crecimiento profesional, amistad, sin dudas debo agradecerte el haberme abierto las puertas del laboratorio de radiofarmacia en el año 2008, apostando a mi trabajo, ¡muchas gracias!

Al Dr. Hugo Cerecetto, por su apoyo incondicional, amistad. No tengo más que palabras de agradecimiento para él por apostar a mi trabajo y darme la oportunidad, junto con Merche, de desarrollarme en esta área, así como en nuevas líneas trabajo en colaboración con otras unidades.

A mi jefa de la Unidad de Aplicación de Técnicas Nucleares en Bioquímica y Biotecnología, Dr. Mary Lopretti, por la oportunidad de desarrollarme en su laboratorio, permitiendo mi continuidad en estas líneas de trabajo, y abriéndome puertas hacia otros horizontes.

A mi esposo, Gastón, que me acompaña día a día, mimándome, respetándome, amándome por sobre todo y ante todo. ¡Agradezco a la vida habernos encontrado mi amor, soy simplemente feliz, gracias!

A mi Familia Gabriela, Carlos y Maxi, me hacen muy feliz y han aportado mucho a mi crecimiento, dándome las herramientas fundamentales para ser mejor persona. Gracias por el amor, el apoyo incondicional y vivir conmigo cada momento como si fuera el último.

A toda mi familia por acompañar este proceso y hacerme sentir querida.

¡A Fio, mi gran amiga, testigo de todas mis locuras, te adoro y gracias por estar siempre ahí!

A mis compañeros y amigos del trabajo, particularmente a Cari, Belu, Marce, Gonza, Gaby y Cristina quienes han colaborado con gran parte del desarrollo

de este trabajo, compartiendo horas de procesamiento, desarrollo de técnicas, discusión de resultados fuera de hora, en algunos casos trasnochadas y por sobre todo quienes fueron un gran apoyo para mí en momentos difíciles.

A mis amigos de la vida, los cuales han estado en todo momento y agradezco que formen parte de todas mis locuras: Naty, Andre, Sole, Ana, Luchi, Mari, Pao, Rodo, Vicky, Caro, Lety, Mica, Andre y Gaby.

A mis amigas y amigos de la Facu, que me apoyaron y me hacen muy feliz con su amistad, particularmente a: María, Mariana, Shia, Adro, Vicent, Germán y Fran.

A mis compañeros y amigos del CIN, por su apoyo incondicional en importantes etapas de mi vida.

A los compañeros del LANOTEC: José, Gaby y Javier, quienes han contribuido en mi desarrollo en la caracterización de nanoestructuras.

Y, por último, a todos los que contribuyeron, directa o indirectamente, en el desarrollo de esta tesis doctoral, ¡mi más sincero agradecimiento!

Dedicatoria

A mi tutora Dr. Mercedes González por su amistad, compartir su pasión por la investigación, así como compartir sus conocimientos en diversos aspectos de la investigación y de la vida. Gracias por haberme dado la oportunidad de conocerla y por haberme apoyado en varias instancias de la misma, sin palabras, sin dudas se te extraña. Sé que desde una estrella siempre nos estarás apoyando.

A mi esposo Gastón quien comparte todos los momentos de mi vida, mi amigo, mi confidente, mi todo, que lindo que la vida nos haya encontrado. ¡Simplemente quiero compartir toda mi vida con vos!

ÍNDICE

Resumen.....	1
Equipamiento y Softwares.....	19
1. Introducción.....	20
1.1. Cáncer	20
1.1.1. Tipos de cáncer	20
1.1.2. Etapas del desarrollo del cáncer.....	21
1.1.3. Cáncer de mama	24
1.2. Nanomedicina	26
1.2.1. Micelas poliméricas (MPs)	29
1.2.1.1. Clasificación de las MPs.....	31
1.2.1.2. Composición de las MPs y metodologías de encapsulación	32
1.2.1.3. Preparación de MPs para aplicaciones biofarmacéuticas	35
1.2.1.4. Biodistribución de las MPs.....	38
1.2.2. Liposomas termosensibles estéricamente estabilizados o pegilados	38
1.3. Problemática actual en el uso de antitumorales: resistencia de las células tumorales a la terapia convencional en condiciones de hipoxia tumoral.....	39
1.3.1. Profármacos bio reducibles en hipoxia	40
1.3.2. Derivados de <i>N</i> -óxido de fenazina.....	41
1.4. Diseño y desarrollo de nuevos candidatos a fármacos	43
1.4.1. Ensayos preclínicos	43
1.4.1.1. Ensayos de toxicidad <i>in vitro</i> -Test de AMES-.....	45
1.4.1.2. Ensayos de toxicidad <i>in vivo</i> -Modelo BALB/c normal y con tumor de mama inducido	48
1.4.1.3. Estudio de toxicidad aguda (Test del -Up and Down-)	49

1.5. Estrategias en el desarrollo de formulaciones nanotecnológicas conjugadas a radionucleídos	50
1.5.1. Estrategias de marcación con ^{99m} Tc de MPs y FNZ	50
1.5.2. Vías de Administración de ^{99m} Tc-MPs	54
2. Objetivo general	55
2.1. Objetivos específicos	55
3. Materiales y Métodos	57
3.1. Materiales	57
3.2. Métodos	58
3.2.1. Síntesis de 5,10-dióxido de 2-amino-7(8)-fluorofenazina (FNZ) a mayor escala y determinación de solubilidad intrínseca en H ₂ O	58
3.2.2. Curva de calibración de FNZ por espectrofotometría para determinación de solubilidad intrínseca en H ₂ O y en MPs	59
3.2.3. Síntesis y caracterización de MPs conjugadas con Glu (T1307-Glu y F127-Glu) por RMN y FTIR.....	60
3.2.4. Caracterización de los MPs libres de fármaco: F127-Glu y T1307-Glu, determinación de la Concentración Micelar Crítica (CMC).....	61
3.2.5. Preparación de las MPs con y sin FNZ.....	62
3.2.6. Preparación de las MPs mezclas con LPS preformadas con y sin FNZ.....	63
3.2.7. Caracterización de tamaño de partícula (Dh), potencial Zeta (Z-pot) e índice de polidispersión (PDI) de MPs y MPs mezclas con LPS por DLS .	64
3.2.8. Análisis morfológico de MPs.....	66
3.2.8.1. Microscopia electrónica de transmisión (MET)	66
3.2.8.2. Microscopía de fuerza atómica (AFM)	66
3.2.9. Estudios <i>in vitro</i> de las nanoformulaciones desarrolladas: Ensayo de liberación de FNZ desde las MPs.....	67

3.2.10. Estudios preclínicos de toxicidad	67
3.2.10.1. Determinación de toxicidad <i>in vitro</i> (Test de AMES)	67
3.2.10.2. Estudios de toxicidad en animales BALB/c normales.....	70
3.2.10.2.1. Estudios de toxicidad aguda en animales BALB/c normales: Test de -Up and Down-	72
3.2.10.2.2. Test de Irwin aplicado a los animales tratados con las nanoformulaciones desarrolladas.....	74
3.2.11. Desarrollo de un modelo tumoral <i>in vivo</i>	75
3.2.11.1. Cultivo de células murinas de cáncer de mama 4T1	75
3.2.11.2. Obtención de modelos de tumores de mama 4T1 en ratones BALB/c.	76
3.2.11.3. Estudios <i>in vivo</i> de evaluación de la actividad antitumoral de los nanosistemas libres y con FNZ encapsulada	76
3.2.11.4. Análisis clínicos post-tratamiento	78
3.2.12. Estrategias de marcación para seguimiento <i>in vivo</i>	80
3.2.12.1. Encapsulación y estudios de biodistribución de MPs a base de T1307 y T1307-Glu cargadas con $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$	80
3.2.12.2. Marcación directa de MPs de T1307 a través $^{99m}\text{TcO}_4^-$	81
3.2.12.3. Biodistribución de $^{99m}\text{Tc-T1307}$ MPs	82
3.2.13. Estudios estadísticos	83
4. Resultados	83
4.1. Síntesis de FNZ y determinación de solubilidad intrínseca para posteriores ensayos de solubilidad en MPs	83
4.2. Conjugación de F127 y T1307 con gluconolactona (Glu)-Caracterización por RMN y FTIR de los conjugados	84

4.3. Valores de CMC obtenidos a partir de DLS de los derivatizados F127-Glu y T1307-Glu en H ₂ O y PBS	88
4.4. Caracterización de tamaño de partícula (Dh), potencial Zeta (Z-pot) e índice de polidispersión (PDI) de MPs y MPs-mezclas con LPS preformados por DLS.....	90
4.5. Estudios morfológicos: MET y AFM de los nanosistemas.....	94
4.6. Ensayos de liberación <i>in vitro</i> de FNZ desde las MPs y MPs-mezclas ..	96
4.7. Test de toxicidad <i>in vitro</i>	101
4.8. Generalidades para los ensayos <i>in vivo</i> en animales BALB/c	105
4.8.1. Vías de administración de fármacos para estudios <i>in vivo</i>	105
4.8.2. Estudio de toxicidad aguda (Test del –Up and Down-)	105
4.8.3. Actividad antitumoral de FNZ cargada en MPs.....	106
4.9. Marcación de FNZ, ^{99m} Tc(CO) ₃ -FNZ, y encapsulación en MPs	113
4.10. Marcación directa con ^{99m} Tc de la poloxamina T1307®.....	117
4.11. Estudio de ^{99m} Tc-T1307 en BALB/c con un tumor 4T1 inducido	117
5. Discusión.....	119
6. Conclusiones.....	125
7. Agradecimiento a programas de financiamiento	125
8. Presentaciones en congresos del trabajo doctoral.....	126
9. Artículos científicos publicados, en revisión o en preparación del trabajo doctoral	127
10. Perspectivas futuras.....	128
11. Anexos	129
12. Bibliografía	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ejemplificado del desarrollo de la carcinogénesis que involucra: proliferación, supervivencia y progresión del tumor nivel celular que involucra mutaciones y la selección de células malignas. Adaptado de 9.....	22
Figura 2. Esquema con las etapas del desarrollo del cáncer. Extraído de 3. ...	23
Figura 3. Estadíos del cáncer de mama luego de su implantación hasta la generación de metástasis en los diferentes órganos del cuerpo. Extraído de: https://www.alchilepoblano.com/60-de-los-casos-de-cancer-de-mama-se-detectan-en-etapas-avanzadas/ (19.07.2019).....	25
Figura 4. Representación esquemática del efecto EPR que permite la permeación y acumulación de nanoestructuras a nivel del microambiente tumoral. Adaptado de 26.	27
Figura 5. Esquema general que representa el diseño de diversas plataformas nanotecnológicas para contribuir y brindar soluciones en el área de la salud humana. Adaptado de 28.	28
Figura 6. Estructura química general del poloxámero F127 (A) y de la poloxamina T1307 (B) a modo de visualizar las porciones de PEO (hidrofilica, azul), PPO (hidrofóbica, rojo) y puente de etilendiamina (verde), según corresponda.	33
Figura 7. Esquema ilustrativo general de los métodos más ampliamente usados para el encapsulamiento de fármacos. Adaptado de 38. A-Equilibrio simple, B-Diálisis, C-emulsión sustancia orgánica/agua, D-disolución fundida y E-secado por congelación.....	36
Figura 8. Representacion de la hipoxia en tumores sólidos. Se muestra una sección del tumor de colon humano (HCT116) tratado con un anticuerpo contra CD31 (en verde) y con pimonidazol (en rojo). Además, se esquematiza la proliferación celular y todos los parámetros que se ven alterados en el ambiente tumoral. Adaptado de 78.	40
Figura 9. Derivados N-óxido descritos: ejemplo de una quinoxalina (A) (81,85), Tirapazamina (B), DACA (C) (86) y 5,10-dióxido de 2-amino-7(8)-fluorofenazina (D). Algunos ya se encuentran en estudios de fases clínicas para su uso en humanos.....	41
Figura 10. Esquema representativo de las grandes etapas: descubrimiento, fase preclínica y fase clínica en el desarrollo de fármacos (91).	45
Figura 11. Imagen ilustrativa de un ensayo tipo en TA98, donde se observa el resultado de un control positivo (A), control negativo (B) y un compuesto que resulta mutagénico (C).	48
Figura 12. Esquema de decaimiento ^{99m}Tc a partir del ^{99}Mo	51
Figura 13. Fotografía del rack del LEA, donde se señala la fila donde fueron alojados los ratones BALB/c al azar. En azul se marca la fila empleada para los ratones de todos los ensayos propuestos.	71

Figura 14. Imagen representando la vía elegida de inyección en ratones BALB/c normales y con tumor de mama inducido, simil fase 4 humano (155). 78

Figura 15. Esquema de los pasos de obtención de FNZ..... 83

Figura 16. Espectro completo de ^1H -RMN entre 0 y 7 ppm de F127-Glu al 20% p/v de DMSO- d_6 , temperatura 22 °C, procesado con software MestReNova... 85

Figura 17. Espectro completo de ^1H -RMN entre 0 y 20 ppm de T1307-Glu al 20% p/v de DMSO- d_6 , temperatura 22 °C, procesado con software MestReNova..... 86

Figura 18. Sección de los espectros de ^1H -RMN de T1307-Glu (rojo) y T1307 (azul) (superpuestos) donde se muestra la región ampliada entre 3.5 y 5.3 ppm procesado con software MestReNova al 20 % p/v de DMSO- d_6 , temperatura 22°C. *Nota: la integración corresponde a los protones del motivo derivado de glucosa en T1307-Glu.* 86

Figura 19. Espectro de ^{13}C -RMN de T1307-Glu al 20 % p/v en DMSO- d_6 , temperatura 22 °C, entre 0 y 230 ppm, procesado con software MestReNova. 87

Figura 20. Espectro de FTIR (A) T1307-Glu liofilizado y (B) T1307 pristino liofilizado a temperatura ambiente..... 88

Figura 21. Microscopias electrónicas TEM de T1307:F127 (A), T1307:F127/FNZ (B), T1307-Glu (C), T1307-Glu/FNZ (D), F127-Glu (E), F127-glu/FNZ (F), F127 LPS (G) y F127 LPS/FNZ (H). Barras de escala: 2 μm 95

Figura 22. Microscopias AFM de: T1307-Glu (A), T1307-Glu/FNZ (B), F127-Glu (C), F127-Glu/FNZ (D). 96

Figura 23. Perfiles de liberación de FNZ a 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 1440, 2880 y 4320 minutos en el caso de T1307 (15% p/v) (A), F127 LPS (10X)(B), T1307:F127 (15% p/v) (C), F127-Glu(15% p/v) (D), y T1307-Glu (15% p/v) (E). Todas las preparaciones se ensayaron a una concentración de 2 mg/mL de FNZ. *Notar que en algunos casos no se siguió hasta 4320 minutos ya que la liberación llegó al 100 % a tiempos menores.*..... 99

Figura 24. Estudio de los diversos modelos matemáticos de ajuste para el análisis del mecanismo de liberación de la FNZ a partir de ajuste orden 0(A), orden 1 (B), Higuchi (C) y kornmeyer-peppas (D) (n=3). Dichos ajustes están con su ecuación de la recta para cada nanosistema y con su coeficiente de correlación (R^2). 100

Figura 25. Gráficos de poder mutagénico en función de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA102, TA100, TA98, TA 1535 Y TA 1537 sin activación metabólica a las 48 horas de exposición con las distintas formulaciones nanoestructuradas (T1307 (15% p/v), F127 LPS (10% p/v), T1307:F127 (15% p/v), F127-Glu (15% p/v) y T1307-Glu (15% p/v) con FNZ encapsulado)..... 104

Figura 26. Evolución de los tamaños tumorales en los diferentes tratamientos con las nanoformulaciones de MPs y mezclas de MPs con LPS (T1307 (15%

p/v), F127 LPS (10 % p/v), T1307:F127 (15 % p/v), F127-Glu (15 % p/v) y T1307-Glu (15 % p/v)) con una posología de 20 mg/kg de FNZ, inyección IP en agua milli-Q (control). * son significativas las diferencias entre los tratamientos, aplicando test t de Student al final del tratamiento, con un p valor ≤ 0.05 108

Figura 27. Evolución de los tamaños tumorales en los diferentes tratamientos con agua milli-Q (control), las nanosuspensiones de MPs y mezclas de MPs (T1307 (15% p/v), T1307:F127 (15% p/v), F127-Glu (15% p/v) y T1307-Glu (15% p/v)) con una posología de 200 mg/kg de FNZ, inyección IP. * son significativas las diferencias entre los tratamientos, aplicando test t de Student al final del tratamiento, con un p valor ≤ 0.05 108

Figura 28. Fotografía ilustrativa representativa ex vivo de los tumores, post tratamiento con agua milli-Q (A) y de las nanoformulaciones de MPs/FNZ y mezclas de MPs con LPS/FNZ control sin tratamiento (A), F127-Glu(15% p/v) (B), T1307-Glu(15% p/v) (C), T1307:F127(15% p/v) (D), (T1307(15% p/v) (E) y F127 LPS(10% p/v) (F)) con una posología de 20 mg/kg de FNZ, inyección IP. Cabe destacar que el tumor post tratamiento F127 LPS(10% p/v)/FNZ(F), se presentaba desgranado (no sólido)..... 109

Figura 29. Análisis de las masas tumorales con los diferentes tratamientos, al finalizar los mismos, con las nanoformulaciones de MPs y mezclas de MPs con LPS (T1307(15% p/v), F127 LPS(10% p/v), T1307:F127(15% p/v), F127-Glu(15% p/v) y T1307-Glu(15% p/v) ($P < 0.05$, $\alpha=0.05$) (A). Si el tumor post tratamiento analizado se presentó sólido, se marcó como (+); de lo contrario, se marcó como (-)(B)(n=6, por tratamiento).****Reducción estadísticamente muy significativa del tamaño tumoral entre el control (tumor sin tratamiento) con las nanoformulaciones de MPs y mezclas de MPs con FNZ ($P < 0.05$, $\alpha=0.05$). ^{ns} no hay significancia estadística. 110

Figura 30. Análisis comparativo de las curvas de supervivencia de las nanoformulaciones de MPs/FNZ y dispersiones con suero fisiológico (SF) y tween 80 (T) (3:1), con una posología de 20 mg/kg de FNZ. El análisis comparativo de las curvas se llevó a cabo a partir del análisis de Kaplan-Meier con la prueba no paramétrica de log-rank con un $*p < 0.05$ (0.036), $X^2 > 3.84$ (6.818) ya descrita en experimental. * Reducción estadísticamente muy significativa de la supervivencia entre posologías de surfactantes convencionales (SF:T) con respecto a las nanoformulaciones de MPs y mezclas de MPs con FNZ. 111

Figura 31. Perfil de HPLC obtenido para la complejación de FNZ y ^{99m}Tc y su porcentaje relativo, así como las impurezas. La pureza radioquímica se obtiene a partir de la integración en el gráfico. 113

Figura 32. Imágenes representativas *in vivo* de rayos X y gamma post inoculación IV de $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ (A) y la nanoformulación T1307-Glu/ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ (B) en ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1 a 1 hora post inyección. La intensidad de rayos gamma se muestra en unidades arbitrarias (a.u.) (ver barra de color) obtenida del equipo bruker *in vivo* FX PRO. (n=4, por formulación). 115

Figura 33. Biodistribución de T1307 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ a 1 y 2 horas post inyección IV en ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1(n=4)..... 116

Figura 34. Biodistribución de T1307-Glu/ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ a 1 y 2 horas post inyección IV en ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1 (n=4)..... 116

Figura 35. Biodistribución de $^{99m}\text{Tc-T1307}$ a 1, 2, 4 y 24 horas post inyección en BALB/c con tumor de mama inducido 4T1 (n=4). *Las diferencias entre los parámetros evaluados son estadísticamente significativas si el p valor es menor a 0.05. 118

Figura 36. Curva de calibración de FNZ en DMSO por espectrofotometría UV-VIS (n=3), para posteriores análisis de eficiencia de encapsulación y análisis de liberación de las diferentes MPs y mezclas de MPs ensayadas encapsulando FNZ a temperatura ambiente. 129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diversas nanoestructuras que se encuentran actualmente en fase clínica y aprobadas (31).....	29
Tabla 2. Resumen de las técnicas más empleadas reportadas para la caracterización de nanoestructuras.....	37
Tabla 3. Resumen de las mutaciones implicadas en cada cepa, así como sus principales características y el operon de histidina involucrado que se vera afectado que implicara la no producción de HIS.	47
Tabla 4. Resumen de los volúmenes de administración reportados empleados para ratones en general. * <i>IP es inoculación intraperitoneal e IV es intravenosa.</i>	78
Tabla 5. Valores normales de análisis clínicos y hematológicos de ratones hembras sanas de 8 semanas de edad (Jackson Laboratory y Chales River, n=158) (154, 155). *Nota: los datos son los descritos para BALB/c hembras de 8 semanas, en similares condiciones de alojamiento.....	80
Tabla 6. Resultados de MPs en agua/mezclas de MPs con LPS. ^a factor de solubilidad (fs) calculado como $S_{\text{FNZ encaps}}/S_{\text{FNZ libre}}$ calculado por UV-VIS a 25°C. $S_{\text{FNZ encaps}}$ es la concentración de FNZ en todas las MPs y $S_{\text{FNZ libre}}$ es la solubilidad intrínseca de FNZ en agua ultrapura; ^b Eficiencia de encapsulación en porcentaje (% EE) a 25°C.	84
Tabla 7. Resultados de CMC de MPs prístinos y glucosilados: F127, F127-Glu en H ₂ O (pH:6.43) y PBS (pH:6.8), T1307 y T1307-Glu en H ₂ O (pH:6.4) y PBS (pH:6.92) a 25°C y 37°C, determinados por DLS. *Los resultados concuerdan con los ya publicados (41,160).....	89
Tabla 8. Resultados de MPs al 15 % p/v de polímero con y sin FNZ en H ₂ O, en términos de diámetro hidrodinámico (D_h), índice de polidispersidad (PDI) a 25°C y 37°C y Z-potencial (z-pot) a 25°C, medidos por DLS. Los cálculos son informados como la media \pm DE.	91
Tabla 9. Resultados de mezclas de MPs con LPS al 10 % p/v de polímero con y sin FNZ, en términos de diámetro hidrodinámico (D_h), índice de polidispersidad (PDI) a 25°C y 37°C y Z-potencial (z-pot) a 25°C, medidos por DLS. Los cálculos son informados como la media \pm DE.....	92
Tabla 10. Resumen de los resultados de MPs y mezclas de MPs con LPS en H ₂ O del ^a factor de solubilidad (fs) calculado como $s_{\text{FNZ encaps}}/s_{\text{FNZ libre}}$, ^b diámetro hidrodinámico (D_h), ^c Índice de polidispersidad (PDI) y ^d potencial zeta (Z-pot) a 25°C. Los cuales han sido seleccionados a ensayar en TEM, AMES e <i>in vivo</i> . Los resultados son informados como la media con su desviación estándar (\pm DE).	93
Tabla 11. Ajustes de regresión en Excel. Se informa constante cinética (según corresponda orden cero, uno y Higuchi) y cálculo del exponente n y constante de Kornmeyer-Peppas.	101

Tabla 12. Número de colonias mutantes de <i>Salmonella typhimurium</i> tratado en distintas condiciones sin activación metabólica (S9). Lo informado son los promedios de las colonias en función de la concentración de FNZ en cada caso MPs/ mezclas de MPs con FNZ encapsulada (T1307/FNZ (15% p/v), F127 LPS/FNZ (10X), T1307:F127/FNZ (15% p/v), F127-Glu/FNZ (15% p/v) y T1307-Glu/FNZ(15% p/v)) con su correspondiente \pm DE(n=3).....	103
Tabla 13. Resumen del estudio de test <i>Up-and-Down</i> con los diferentes tratamientos con las nanoformulaciones de MPs y mezclas de MPs con LPS (T1307 (15% p/v), F127 LPS (10X), T1307:F127 (15% p/v), F127-Glu (15% p/v) y T1307-Glu (15% p/v). ^a (130,133); ^b La prueba se realizó a las 0.5, 1.5, 3, 5, 12, 24, 48 y 72 horas después de la administración IP. Si todos los parámetros analizados fueron similares al tratamiento con PBS, se marcó como (+); de lo contrario, se marcó como (-); ^c (-) denota ausencia de alteraciones o adherencias de órganos.....	105
Tabla 14. Valores obtenidos del análisis bioquímico en ratones BALB/c: sin tumor (normales), con tumor sin tratamiento y post tratamiento con las nanoformulaciones con FNZ (2 mg/mL) más promisorias.....	112
Tabla 15. Valores obtenidos del análisis hematológico (A) y bioquímico (B) en ratones BALB/c: sin tumor (normales), con tumor sin tratamiento y post tratamiento con las nanoformulaciones con FNZ (2 mg/mL).....	113
Tabla 16. Resultados en base a lo obtenido por ITLC y HPLC para ^{99m} Tc(CO) ₃ -FNZ con su desviación estándar (\pm DE).....	114
Tabla 17. Relaciones de actividad por gramo tumor/músculo (T/M) para las formulaciones ensayadas ^{99m} Tc(CO) ₃ -FNZ, T1307-Glu / ^{99m} Tc(CO) ₃ -FNZ y T1307/ ^{99m} Tc(CO) ₃ -FNZ.	117
Tabla 18. Relaciones en masa y volumen de cada uno de los componentes de medio mínimo selectivo para revertientes HIS ⁺	130
Tabla 19. Relaciones en masa y volumen de cada uno de los componentes de medio mínimo selectivo para revertientes HIS ⁺ para la preparación de un litro de medio.	131
Tabla 20. Relaciones en masa y volumen de cada uno de los componentes de agar blando para 0.1 L de medio completo.	132
Tabla 21. Cálculo de masa y volumen de cada uno de los componentes de 0.5 mM Hisitidina/ 0.5 mM Biotina para 0.1 L total.	133
Tabla 22. Relaciones en concentración de cada uno de los reactivos a emplear para la mezcla de S9.....	133
Tabla 23. Relaciones en masa y volumen de cada uno de los componentes de la mezcla S9. En negrita en la relación empleada en los ensayos de la presente tesis (no reportado, a completar).....	134
Tabla 24. Tabla representativa de reporte de datos diarios (test de Irwin) para cada animal BALB/c.	136

ÍNDICE de Abreviaturas y Fórmulas Empleadas

A

Aroclor, obtenido de Moltex Inc. (Annapolis, MD, EEUU)

B

Bacto[®] agar (Difco, EEUU)

C

Células de tumor mamario murino 4T1 CRL-2539[™], American Type Culture Collection (ATCC, EE.UU.)

C₃H₆O, Acetona (May & Baker, EE.UU.)

C₃H₆O, Acetona (Droguería Industrial Uruguay, URUGUAY)

C₂H₃N, Acetonitrilo PPA (ACS EP, Carlo Erba)

C₂H₄O₂, Ácido acético (Merck, CHINA)

CMC, Concentración Micelar Crítica

D

DMF, Dimetilformamida anhidra (SIGMA, EE.UU.)

DMSO, Dimetilsulfóxido anhidra (SIGMA Aldrich, EE.UU.)

DMSO p.a., Dimetilsulfóxido (EMSURE[®] ACS, ALEMANIA)

DMSO-d₆, Dimetilsulfóxido deuterado (SIGMA Aldrich, EE.UU.)

DMAP, 4-Dimetilaminopiridina, (SIGMA, Argentina)

DCC, Dicicloexilcarbodiimida, (SIGMA, Argentina)

E

EtOAc, Acetato de etilo (Dorwil, ARGENTINA)

Et₃N, Trietilamina (SIGMA, EE.UU.)

Et₂O, Éter etílico ACS (Dorwil, ARGENTINA)

EtOH, Etanol (DORWIL, Argentina)

EPR, Efecto Permeabilidad y Retención mejorada, del inglés *Enhanced Permeability and Retention*

F

FNZ, 5,10-dióxido de 2-amino-7(8)-fluorofenazina

4-Fluoro-2-nitroanilina (Sigma, EE.UU.)

F127[®], Pluronic F127 (BASF corporation)

FDA, Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos

FTIR, Espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier

SnF₂, Fluoruro de estaño (Sigma-Aldrich, EE.UU.)

G

⁹⁹Mo-^{99m}Tc, Generador ⁹⁹Mo-^{99m}Tc (TecnoNuclear, Buenos Aires, Argentina)

Glu, Gluconolactona, Lactona del ácido 1,2,3,4,5-pentahidroxipropoico, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)

H

Hipoclorito de sodio (Grupo BENZO, URUGUAY)

HCl, Ácido clorhídrico (36,5-38,0%), ACS. (Dorwil, ARGENTINA)

H₂O, Agua MilliQ ultrapura (equipo CIN)

I

ITLC-SG, cromatografía en capa fina (Pall Corporation, EEUU)

IP, Intraperitoneal

IV, Intravenosa

J

K

Kit Tricarbonilo, Isolink (Mallinckrodt, EEUU)

L

LD₅₀, dosis letal 50, dosis a la cual mueren el 50 por ciento de los animales

M

MeOH, Metanol, ACS. (Dorwil, ARGENTINA)

Membrana de diálisis, *cut off* 3500 Da (Spectra Por®, EEUU)

MDT, máxima dosis tolerada.

N

NaOH, Hidróxido de sodio ACS. (Dorwil, ARGENTINA)

n-hexano, ACS. (Dorwil, ARGENTINA)

4-nitro-fenilendiamina (Sigma-Aldrich, EE.UU.)

Nitrógeno gaseoso de alta pureza (AGA, Uruguay).

NaCl, Cloruro de sodio (Fluka-Garantie, EE.UU.).

O

OECD, Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico.

P

PA, Principio activo

p-aminofenol, (SIGMA, EEUU)

PBS 1X, Buffer fosfato salino.

% p/v, porcentaje peso(g)/volumen(mL)

Q

R

RPMI 1640, medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 es adecuado para una variedad de células de mamíferos formulado con Glutamina estable (Capricorn, EE.UU.)

S

SFB, Suero fetal bovino (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, EE.UU.).

SFM, Sistema Fagocítico Mononuclear.

T

T1307®, Tetronic 1307 (BASF corporation, Argentina)

THF, Tetrahidrofurano (DORWIL, Argentina)

TFA, Ácido trifluoroacético (DORWIL, Argentina)

Tripsina-EDTA, Tripsina-EDTA 0,25 % en PBS (Capricorn, EE.UU.)

U

URBE, Unidad de reactivos biológicos de experimentación, Facultad de medicina UdelaR.

UV-VIS, Espectroscopía UV-Visible

V

W

W1, Whatman 1 mm (Whatman International Ltd., EE.UU.).

X

Y

Z

Z-pot, Potencial zeta.

Equipamiento y Softwares

Liofilizador (Labconco Lyph Lock 6 y L05, F.i.c, Scientific Instrumental Manufacturing, Buenos Aires, Argentina).

FTIR, Espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier.

Espectrofotómetro (Thermo scientific, modelo Evolution 160 UV-Vis).

TEM, Microscopio electrónico de transmisión (JEM-1010, JEOL, a una tensión de aceleración de 120 kV, cámara CCD AMT de 2k x 2k para la adquisición de imágenes digitales, Japón).

Balanza analítica (Shimadzu, modelo AUX 220).

Cámara de flujo laminar vertical (HITACHI, modelo Clean Bench).

Estufa al 5 % de CO₂ a 37°C.

Microscopio invertido (Motic, Hong Kong).

HPLC, Cromatografía líquida de alta resolución, del inglés, *High-performance liquid Chromatography* (Agilent 1200 Series Infinity Star, Santa Clara, EEUU).

Zetasizer, Nano-ZS modelo ZEN3600, provisto de láser He-Ne (633 nm) (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Zetasizer Software v7.12 (Malvern, Panalytical).

Equipo ORTEC, contador de centelleo sólido con detector de cristal NaI (TI) "3x3" asociado con un analizador de canal único analizador monocanal, (ORTEC, Oak Ridge, TN).

AFM, Microscopio de Fuerza Atómica (MFP 3D, Asylum Research, modo AC/Air, punta de silicio).

Equipo FX PRO, cámara de imagenología In-Vivo FX PRO *para In vivo/Ex vivo de fluorescencia/rayos X/gamma* (BRUKER Corporation, Billerica, MA, EE.UU.).

Programa GraphPad Prism versión 6.01 para Windows.

Equipo de resonancia magnética nuclear Bruker 600 Hertz (BRUKER Corporation, Billerica, MA, EE.UU.).

1. Introducción

1.1. Cáncer

El cáncer se desarrolla cuando el proceso celular normal, controlado y ordenado de generación de nuevas células, se ve alterado por mutaciones genéticas. Dicha alteración genera una aceleración de la tasa de división celular o inhibición de los controles normales del sistema, como la detención del ciclo celular o la muerte celular programada. Particularmente, ocasiona la activación de oncogenes y en algunos casos la desactivación de los genes supresores de tumores (1). Finalmente, se evidencia una supervivencia de células genéticamente modificadas que sobreviven a este estadio. Dados los procesos y mecanismos mencionados, es que se genera lo que se conoce como masa tumoral (2), con la concomitante generación de daño al sistema inmune y otras deficiencias que podrían ocasionar hasta la muerte del paciente (3, 4).

1.1.1. Tipos de cáncer

Los tipos de cáncer se generan de acuerdo a las diferentes células del cuerpo, mecanismos de regulación, entre otros, por lo que existen más de cien tipos distintos de tumores, y que se diferencian en su desarrollo, comportamiento y respuesta al tratamiento. Se clasifican en dos grandes tipos: tumores benignos y tumores malignos (3). Los cuales se diferenciarán en base a su agresividad, descrito a continuación.

Un tumor benigno permanece confinado en su ubicación original, sin invadir el tejido normal circundante y sin migración a sitios del cuerpo distantes, con lo que, en líneas generales, puede ser extirpado quirúrgicamente. Mientras que, por el contrario, un tumor maligno es capaz de invadir el tejido normal circundante, proliferar y propagarse a través de los sistemas circulatorio o linfático, a diferentes sitios del cuerpo generando lo que se conoce como metástasis, siendo esta capacidad singular lo que lo convierte en un tumor de alta peligrosidad para el paciente con la enfermedad. Dicha propagación a

sitios del cuerpo distantes hace a este tipo de tumores resistentes a tratamientos localizados en la mayoría de los casos **(3-5)**.

Es así, que tanto los tumores benignos como los malignos son clasificados según el tipo de células de las cuales se generan. Entre ellos, se pueden destacar: carcinomas, sarcomas y leucemias o linfomas.

Los carcinomas, que incluyen aproximadamente el 90% de los cánceres humanos, son neoplasias malignas de las células epiteliales. En cuanto a los sarcomas, se presenta raramente en humanos, son tumores sólidos provenientes de los tejidos conectivos, como los músculos, huesos, cartílagos y tejidos fibrosos. Mientras que, las leucemias y los linfomas, representan aproximadamente el 8% de las neoplasias malignas humanas, y surgen de las células formadoras de sangre y de las células del sistema inmunitario, respectivamente **(2)**.

Los cuatro cánceres de mayor incidencia y que representan más de la mitad de todos los casos de cáncer en humanos, son: mama, próstata, pulmón y colon/recto **(6-8)**.

1.1.2. Etapas del desarrollo del cáncer

La clasificación del cáncer en estadios es un proceso de múltiples etapas a nivel celular que involucra mutaciones, selección celular, interacción de alteraciones genéticas/epigenéticas y factores ambientales, que les otorga a las células la capacidad de: proliferar, sobrevivir y avanzar descontroladamente generando la enfermedad (ver **Figura 1**) **(3)**.

El primer paso en el proceso, iniciación del tumor, es el resultado de una alteración y/o modificación genética que conduce a la proliferación anormal de una célula. La proliferación celular conduce al crecimiento de una población de dicha célula anormal derivada clonalmente, la cual continúa a medida que ocurren mutaciones adicionales de las células generando la enfermedad. Algunas de estas mutaciones otorgan ventajas selectivas a las células, como

un crecimiento más rápido, y los descendientes de tal mutación se convertirán en dominantes en la población tumoral. El proceso consiste en selección clonal, ya que un nuevo clon de células tumorales ha evolucionado en función de su mayor tasa de crecimiento u otras propiedades que confieren una ventaja selectiva. Dicha selección, continúa a lo largo del desarrollo del tumor, convirtiéndolo en un tumor de mayor malignidad (invasivos, alta tasa de proliferación y supervivencia) que podría generar la invasión y metástasis en otros tejidos como hueso, pulmón, hígado y ganglios linfáticos (9) (ver **Figura 2**).

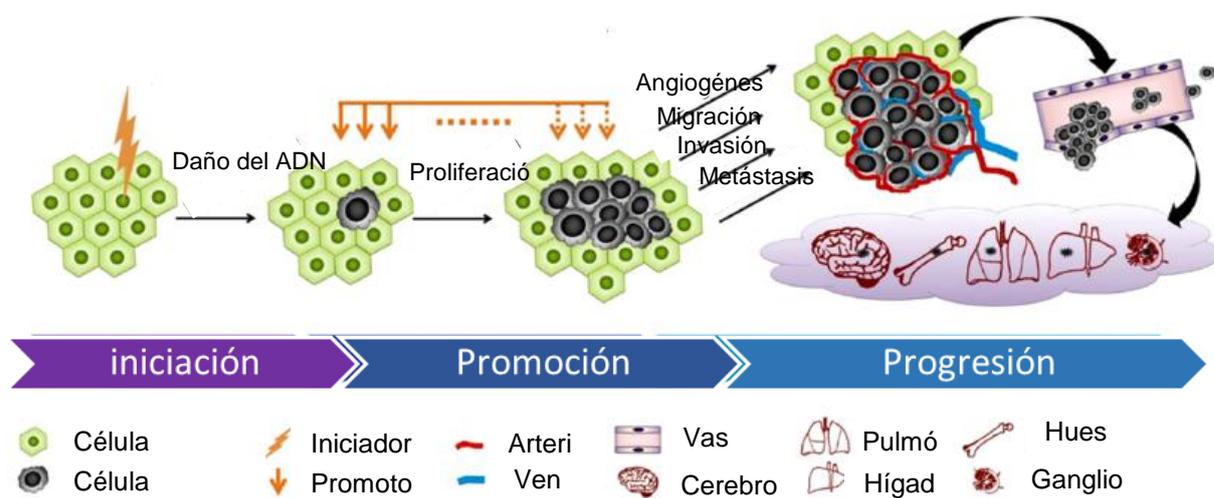


Figura 1. Esquema ejemplificado del desarrollo de la carcinogénesis que involucra: proliferación, supervivencia y progresión del tumor nivel celular que involucra mutaciones y la selección de células malignas. Adaptado de 9.

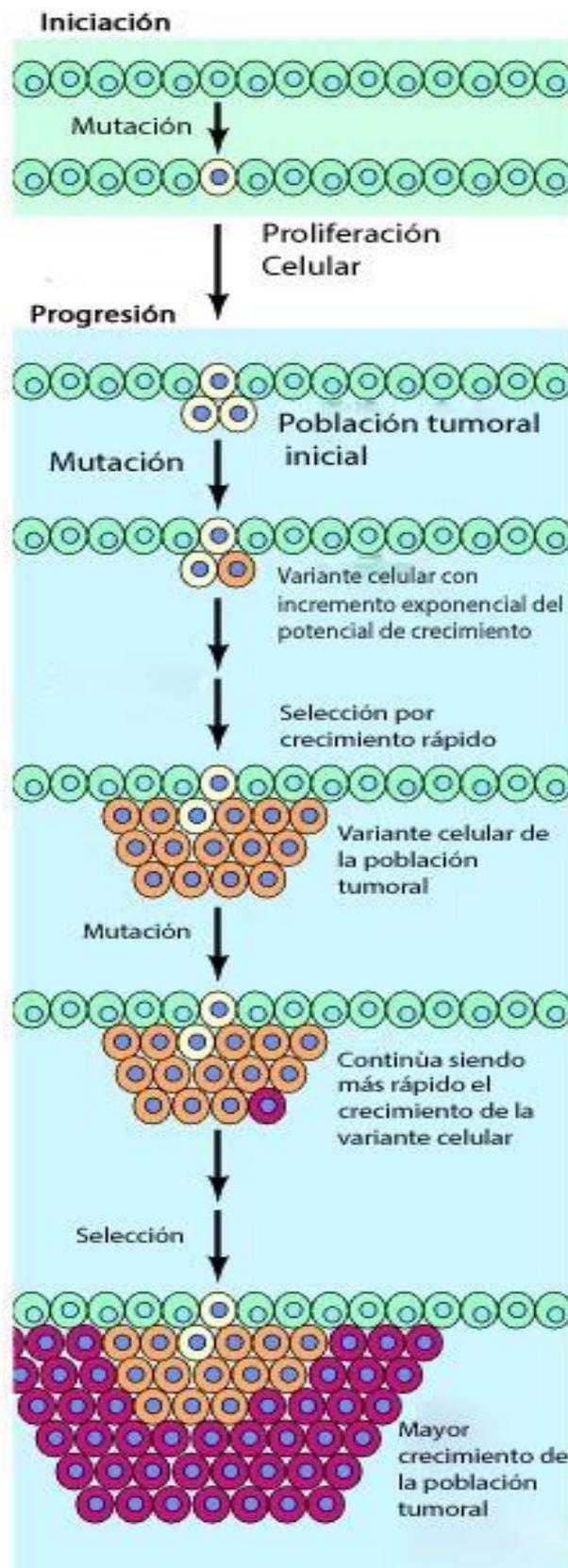


Figura 2. Esquema con las etapas del desarrollo del cáncer. Extraído de 3.

1.1.3. Cáncer de mama

El cáncer de mama se presenta como la segunda causa de mortalidad en mujeres a nivel mundial (luego del cáncer de pulmón) y se muestra en aumento en los últimos años, con una incidencia de 439 por cada 100000 hombres y mujeres por año; y una tasa de muerte de 163.5 por cada 100000 hombres y mujeres por año. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha evidenciado que a nivel de la población objetivo se evidencia una prescripción de diferentes fármacos para tratar el cáncer de mama en estadios avanzados, por lo que se indica que la erradicación del cáncer de mama se basa en la detección y tratamiento temprano (10-12). Asimismo, existe una gran diferencia en las tasas de supervivencia del cáncer de mama en todo el mundo, con una supervivencia estimada menor del 40% en los países subdesarrollados y del 80% para los países desarrollados (13). Se reportan cerca de 1.5 millones de nuevos casos de cáncer de mama por lo que es crítico la búsqueda de nuevas formas de tratamiento efectivas, eficaces y seguras para esta enfermedad prevalente, con alta tasa de malignidad (15).

En este sentido, los países en desarrollo como Uruguay, enfrentan limitaciones de cantidad de recursos e infraestructura, para lograr su erradicación. Es así que, volcando esfuerzos en formación de recursos humanos, se verá un impacto directo en el reconocimiento, diagnóstico, manejo oportuno y en el desarrollo de la medicina personalizada (14-16).

Particularmente en el cáncer de mama, se puede destacar que, es una enfermedad altamente heterogénea con clasificaciones complejas. En primer lugar, se clasifica según el tipo histopatológico y dependiendo el sitio, en invasivos y no invasivos, siendo la mayoría de los casos carcinomas ductales invasivos. En este sentido, algunos subtipos de baja prevalencia vienen tomando mayor atención debido a su agresividad y su aparición en diferentes subpoblaciones de pacientes. Por ejemplo, el cáncer de mama inflamatorio a menudo ocurre en pacientes más jóvenes (17). Muy recientemente *cancer.org* (18), reporta que las etapas del cáncer de mama dependen del tamaño y tipo de tumor, así como cuánto han penetrado y migrado las células tumorales en

los tejidos mamarios (19). En este aspecto, los estadios de cáncer de mama, se clasifican de la etapa 0 a 4. La etapa 0 describe la fase no invasiva y la etapa 4 describe el tipo invasivo de tumor (ver **Figura 3**).

En base al grado de avance del cáncer de mama, el tumor primario dentro de la mama (etapa 1) se propaga a los tejidos y ganglios linfáticos cercanos (etapa 2-3) y/o a los órganos distantes (metástasis a distancia, etapa 4).

Particularmente la etapa 4 se caracteriza por ser la situación más avanzada y metastásica del cáncer, donde se evidencia la propagación a otros órganos del cuerpo, la propagación a otros órganos del cuerpo, tales como pulmones, huesos, cerebro e hígado (entre otros) (ver **Figura 3**) (15, 18). La tasa de supervivencia en este estadio es del 22% a cabo de 5 años, reportada por la American Cancer Society (ACS). Por lo que el diseño de nuevas terapias contra órganos metastatizados es sumamente relevante, objetivo del desarrollo de dicha tesis.

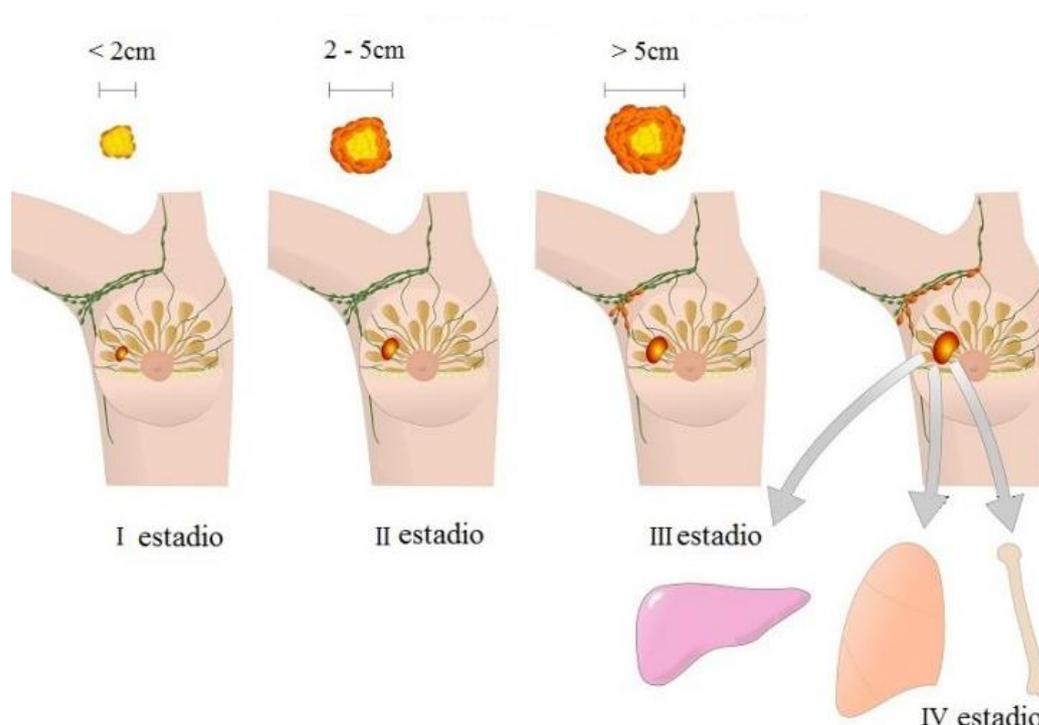


Figura 3. Estadios del cáncer de mama luego de su implantación hasta la generación de metástasis en los diferentes órganos del cuerpo. Extraído de: <https://www.alchilepoblano.com/60-de-los-casos-de-cancer-de-mama-se-detectan-en-etapas-avanzadas/> (19.07.2019).

1.2. Nanomedicina

La nanomedicina se puede definir como una emergente disciplina que estudia la ciencia y tecnología de materiales definidos a una escala con particularidades fisicoquímicas inherentes a la dimensión nanométrica que no ocurren a escala micro y macrométricas (20-22).

Dicha disciplina involucra el desarrollo de novedosos nanomateriales /nanosistemas de diagnóstico, tratamiento, prevención de enfermedades y heridas traumáticas, procurando alivio del dolor, preservación y mejoramiento de la salud humana (22). Para el cumplimiento de dichos propósitos, se debe utilizar herramientas y conocimientos sobre el cuerpo humano a escala molecular para su posterior aplicación (20-22).

Dentro de la medicina se ha focalizado en el desarrollo de nanosistemas con características y propiedades estructurales únicas, las cuales principalmente están siendo reportadas aplicadas en patologías como el cáncer de mama, colon, melanoma, así como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, entre otras (20, 21, 23).

Estos nanosistemas se han desarrollado como “*carriers* o vehículos” que permiten el transporte activo y/o pasivo hacia el microambiente tumoral, debido a vasos sanguíneos inconsistentes (diámetro, forma irregular, protuberancias anormales y extremos ciegos); ausencia de tejidos de soporte de la vasculatura; hiperpermeabilidad vascular; fenestraciones de 100 nm a 2 μ m de diámetro (dependiendo del tipo tumoral); sistema linfático deficiente y un entorno favorable termodinámicamente en términos de retención de nanopartículas, siempre y cuando sean más pequeñas que los poros “huecos” endoteliales.

Dichas características generan un efecto a nivel del microambiente tumoral que se conoce como Efecto de Permeabilidad y Retención Mejorada (EPR), y se presenta como una de las principales estrategias para el diseño de novedosos agentes de terapia contra diferentes tipos de cáncer (Ver **Figura 4**) (24-27).

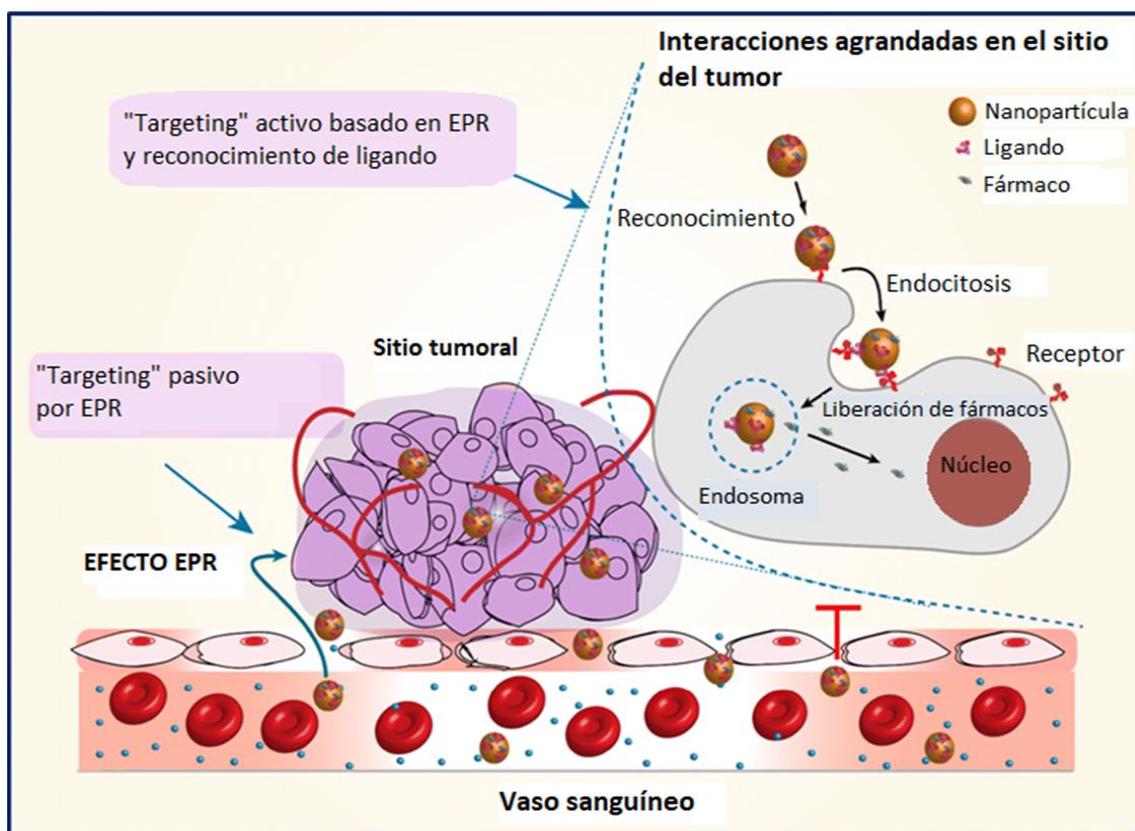


Figura 4. Representación esquemática del efecto EPR que permite la permeación y acumulación de nanoestructuras a nivel del microambiente tumoral. Adaptado de **26**.

El efecto EPR además posibilita el empleo de una serie de nanosistemas de acción dual, diagnósticas y terapéuticas, lo que se conoce como teranós (ver **Figura 4**). En los últimos años, se ha avanzado en la biología molecular del cáncer de mama, y gracias a ello, se han desarrollado diversas estrategias que utilizan sistemas nano-terapéuticos y/o de diagnóstico novedosos.

Por lo que estamos frente a una alternativa prometedora particularmente para el tratamiento del cáncer de mama (**28-32**).

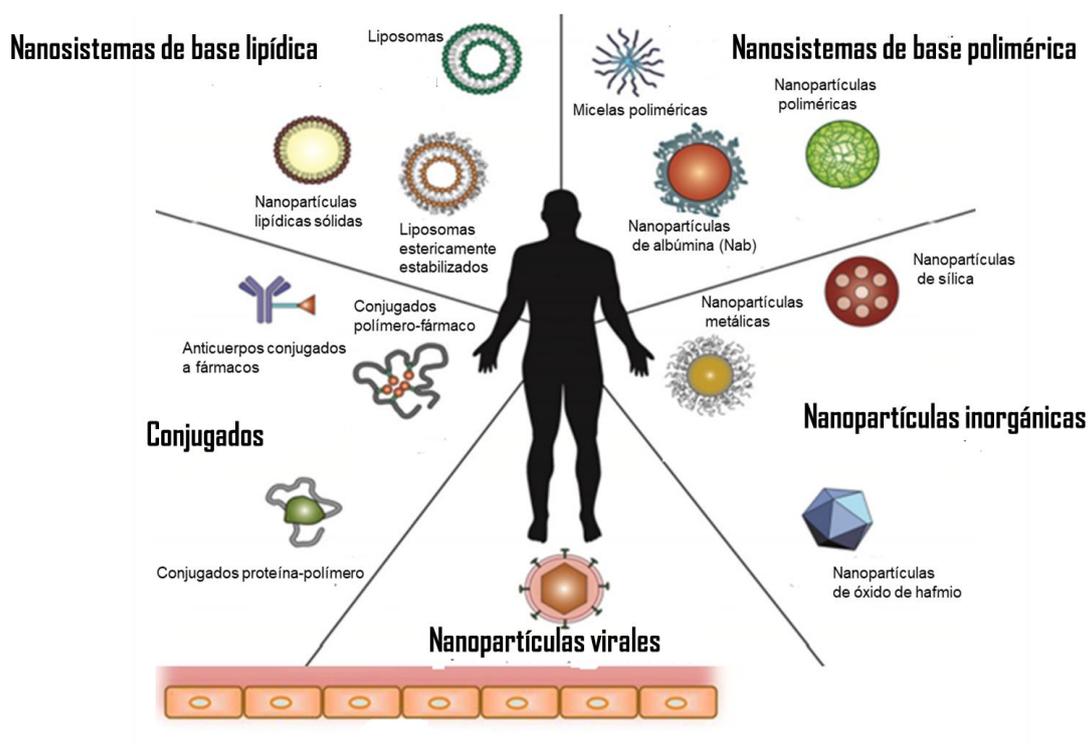


Figura 5. Esquema general que representa el diseño de diversas plataformas nanotecnológicas para contribuir y brindar soluciones en el área de la salud humana. Adaptado de **28**.

En el mercado existen productos nanoestructurados con fines biomédicos como Doxil[®] y Abraxane[®] (**32**), entre otros, los cuales se utilizan para el tratamiento adyuvante en cáncer de mama con resultados clínicos favorables (ver **Tabla 1**).

Particularmente, Genexol-MP[®] es uno de los productos que actualmente se encuentra en fase clínica a base de MPs de PEO-PLA y que contiene paclitaxel y que han demostrado un aumento de la MDT, en comparación al tratamiento convencional a base de CremophorEL como vehículo, el cual es conocido por su elevada cardiotoxicidad (ver **Tabla 1**).

Asimismo, existen diversos nanosistemas para el tratamiento del cáncer, que aún se encuentran en Fase Clínica 1. Sin embargo, estos productos fueron diseñados originalmente con propósitos como anticancerosos genéricos y no

específicamente para el tratamiento del cáncer de mama (30-34), objeto de estudio de la presente tesis.

Name	Formulation	Bioactive compound	Indication	Status
Liposomes				
DaunoXome®	Non-PEGylated liposomes	Daunorubicin	Kaposi's sarcoma	Approved
Myocet®	Non-PEGylated liposomes	Doxorubicin	Breast cancer	Approved
Onco TCS®	Non-PEGylated liposomes	Vincristine	Non-Hodgkin's lymphoma	Approved
Depocyt®	Non-PEGylated liposomes	Cytarabine	Leukemia	Phase III
			Glioblastoma	Phase I/II
Doxil®/Caelyx®	PEGylated liposomes	Doxorubicin	Breast cancer, ovarian cancer, multiple myeloma, Kaposi's sarcoma	Approved
Thermodox®	PEGylated liposomes	Doxorubicin	Liver cancer, breast cancer	Phase III
SPI-77	PEGylated liposomes	Cisplatin	Ovarian cancer	Phase II
NL CPT	PEGylated liposomes	Irinotecan	Glioma	Phase I
Polymeric nanoparticles				
Genexol-PM®	PEG-poly(lactic acid)	Paclitaxel	Breast cancer, lung cancer, ovarian cancer	Phase II
NK105	PEG-poly(aspartic acid)	Paclitaxel	Gastric cancer	Phase I
			Breast cancer	Phase III
NK911	PEG-poly(aspartic acid)	Doxorubicin	Various solid tumors	Phase II
Opaxio™	PGA-paclitaxel	Paclitaxel	Lung cancer, ovarian cancer	Phase III
CRLX101	PEG-cyclodextrin	Camptothecin	Non-small-cell lung cancer	Phase II
NC-6004	PEG-poly(glutamic acid)	Cisplatin	Pancreatic cancer	Phase II
ProLindac™	HPMA	DACH-Pt	Ovarian cancer	Phase II
Other				
Abraxane®	Albumin-based	Paclitaxel	Breast cancer	Approved
Paclical®	Micellar retinoid-derived	Paclitaxel	Ovarian cancer	Phase III
NC-4016	Micellar PEG/polyamino acid	Oxaliplatin	Various solid tumors	Phase I/II
Oncaspar®	PEG-L-asparaginase	Asparagine specific enzyme	Acute lymphoblastic leukemia	Approved

Note: DaunoXome® (Galen US Inc., Souderton, PA, USA); Myocet® (Sopherion Therapeutics Inc., Princeton, NJ, USA); Onco TCS® (Inex Pharmaceuticals Corp., Burnay, BC, Canada, and Enzon Pharmaceuticals Inc., Bridgewater, NJ, USA); Depocyt® (Pacira Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA, USA); Doxil®/Caelyx® (Janssen Biotech Inc., Horsham, PA, USA / Janssen-Cilag Pty Ltd, Macquarie Park, NSW, Australia); Thermodox® (Celsion Corporation, Lawrenceville, NJ, USA); Genexol-PM® (Samyang Biopharmaceuticals Corporation, Jongno-gu, Seoul, Korea); Opaxio™ (Cell Therapeutics, Inc., Seattle, WA, USA); ProLindac™ (Access Pharmaceuticals Inc., Dallas, TX, USA); Abraxane® (Celgene Corporation, Inc., Berkeley Heights, NJ, USA); Paclical® (Oasmia Pharmaceutical AB, Uppsala, Sweden); Oncaspar® (Enzon Pharmaceuticals Inc., Bridgewater, NJ, USA).
Abbreviations: PEG, poly(ethylene glycol); HPMA, hydroxypropylmethacrylamide; DACH-Pt, diamincyclohexane-platinum.

Tabla 1. Diversas nanoestructuras que se encuentran actualmente en fase clínica y aprobadas (31).

1.2.1. Micelas poliméricas (MPs)

Las MPs fueron propuestas por primera vez como vehículos para el transporte de fármacos por Ringsdorf en 1984 y desde entonces se ha desarrollado una extensa línea de en el uso de estos materiales biocompatibles (35, 36).

Las MPs son estructuras esféricas formadas por el autoensamblado espontáneo en agua de moléculas poliméricas anfífilas por arriba de una

concentración crítica llamada "Concentración Micelar Crítica" (CMC) (37-45). Una molécula anfifílica está constituida por una porción o segmento hidrofílico con alta afinidad por el agua y una porción o segmento hidrofóbico con poca o baja afinidad por el agua. Es así que, las moléculas anfifílicas son monómeros a muy bajas concentraciones, pero a medida que la concentración de estos se incrementa en el medio acuoso, la agregación hacia estructuras micelares se lleva a cabo dentro de un estrecho intervalo de concentración (41).

Los tamaños hidrodinámicos que pueden desplegar las MPs en medio acuoso varían dependiendo de las propiedades inherentes al material polimérico que las conforman, así como de las condiciones del medio, entre ellas: pH, temperatura y concentración iónica, entre otros.

Las MPs poseen una arquitectura de núcleo/corona (*core/shell*) esférica donde el segmento hidrofóbico de las moléculas anfifílicas conforma el núcleo, mientras que el segmento hidrofílico forma la corona exterior (36-39), permitiendo, de esta manera, la incorporación total o parcial de moléculas hidrofóbicas con actividad biológica en su interior (37-45). Estas pueden diseñarse en relación al tipo, las propiedades fisicoquímicas y la vía de administración a emplear del fármaco de estudio (45-49). Esto se debe a la presencia de las dos grandes regiones bien diferenciadas, ya mencionadas previamente: (i) el núcleo hidrófobo y (ii) la cola hidrofílica (ver **Figura 6, apartado 1.2.1.2.**).

Dentro de las ventajas más destacables de las MPs frente a las micelas convencionales, se incluyen (25, 35, 45, 51-53):

- ✓ Solubilización por atrapamiento en el núcleo de moléculas con actividad biológica poco solubles en medio acuoso;
- ✓ Liberación sostenida;
- ✓ Tamaño reducido;
- ✓ Protección de las sustancias encapsuladas de la degradación y el metabolismo cuando se encuentran en circulación;
- ✓ Mejora los efectos farmacocinéticos;
- ✓ Baja toxicidad;

- ✓ Sin actividad farmacológica o efectos adversos;
- ✓ Más estables frente a la dilución;
- ✓ Crio/liofi-protección en procesos de congelamiento/liofilización;
- ✓ La PEGylación las hace más furtivas debido a que les otorga mayor semivida plasmática, por retrasar los fenómenos de opsonización;
- ✓ Algunos copolímeros lineales derivados del tipo Pluronic® inhiben PGPs (transportadores de eflujo de fármacos que se encuentran en membrana de intestino, BHE, hígado, riñones, etc).

1.2.1.1. Clasificación de las MPs

Las MPs pueden ser clasificadas de acuerdo al tipo de interacciones intermoleculares que dirigen la segregación de los segmentos que conforman el "núcleo", las cuales se separan por afinidad en presencia de un medio acuoso. Se podrían diferenciar tres categorías: las micelas anfifílicas (formadas por interacciones hidrofóbicas), los complejos poliiónicos (CPIM) (formados por interacciones electroestáticas) y micelas derivadas de complejos metálicos. Generalmente cuando el segmento hidrófilo es más largo que el bloque del núcleo, el tipo de forma micelar es esférica con una distribución de tamaño uniforme. Mientras que, a la inversa, cuando es mayor la longitud de los segmentos del núcleo con respecto a la de las cadenas que conforman la "corona", se podrían generar varias estructuras no esféricas como lamelas (40).

Como bien ya se ha descrito, las MPs son generadas por el auto-ensamblado espontáneo en medio acuoso a partir de bloques anfifílicos o de copolímeros "graft" (una cadena de polímero principal, a la que se unen una o más cadenas laterales, conectados químicamente a través de enlaces covalentes). En general las MPs combinan segmentos hidrofílicos de óxido de polietileno (PEO) o polietilenglicol (PEG) con segmentos hidrofóbicos de distinta naturaleza.

Entre varios materiales que se han empleado para la preparación de MPs, se pueden destacar aquellos a base de copolímeros di y tri-bloque de poliésteres y polipéptidos, entre otros, como:

- ✓ PEG-polipropilenglicol (PPO)
- ✓ PEG-poli aminoácidos (PAA)
- ✓ PEG-poliésteres (PLA, PGA, PLGA, PCL)
- ✓ PEG-polimetacrilatos (PMA)
- ✓ PEG-poliacrilamidas (PAAm)
- ✓ PEG-poli (óxido de estireno) (PSO)

Asimismo, la corona hidrofílica está formada por PEG, polímero biocompatible que no presenta prácticamente efectos indeseables con proteínas o células, como las del sistema SFM, y le aumenta la vida media en circulación, impidiendo el reconocimiento por macrófagos y proteínas del medio, haciendo de esta manera a las MPs más furtivas respecto de las micelas convencionales (ver en Biodistribución de las MPs, apartado 1.2.2.4) (44, 54). Por otro lado, es importante analizar el Balance Hidrofílico/Lipofílico (BHL) de dichos copolímeros y sus mezclas, ya que éste variará según la proporción de segmentos presentes de óxido de etileno/óxido de propileno (EO/PO), permitiendo una optimización de la eficiencia de encapsulación de fármacos insolubles en medios acuosos, además de otorgar estabilidad física al sistema (39, 53). Es importante dicho balance, ya que la pérdida de equilibrio hidrófilo/hidrófobo al aumentar la carga del fármaco hidrófobo en la región del núcleo, podría dar una disminución de la estabilidad de las micelas (39).

Asimismo, formulaciones de MPs liofilizadas han demostrado que poseen excelente redispersión en medio acuoso y una estabilidad mejorada a largo plazo.

1.2.1.2. Composición de las MPs y metodologías de encapsulación

Los poloxámeros Pluronic® son estructuras lineales basadas en tribloques de copolímeros no iónicos, compuestos de una cadena central hidrófoba de poli (óxido de propileno) (PPO) flanqueado por dos cadenas hidrófilas de poli óxido etileno (PEO) (ver **Figura 6A**) (55). Mientras que las poloxaminas Tetronic® están formadas por cuatro cadenas lineales de poli (óxido de etileno) -poli

(óxido de propileno) (PEO-PPO) funcionalizadas con un core central de etilendiamina (**56**, **57**) (ver **Figura 6B**). Ambas familias de copolímeros sintéticos están aprobadas por la agencia estadounidense de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).

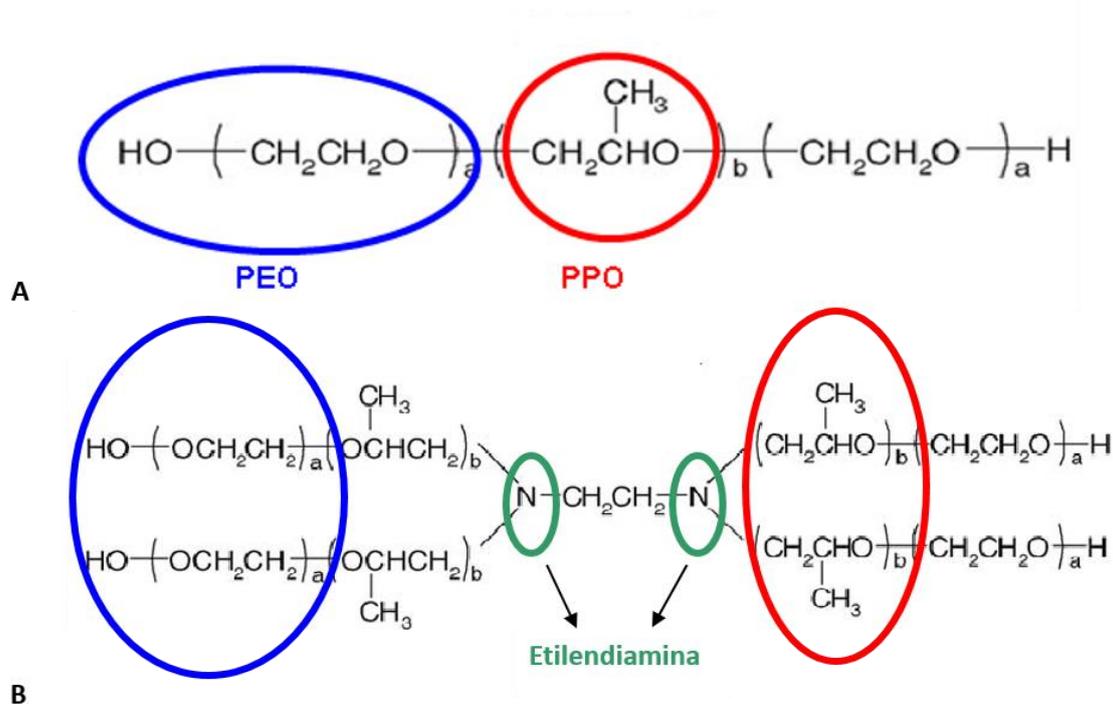


Figura 6. Estructura química general del poloxámero F127 (A) y de la poloxamina T1307 (B) a modo de visualizar las porciones de PEO (hidrofílica, azul), PPO (hidrofóbica, rojo) y puente de etilendiamina (verde), según corresponda.

Estos copolímeros de PEO-PPO se conocen como Materiales Inteligentes (*Smart Materials*) ya que son líquidos a temperatura ambiente, pero pueden formar hidrogeles físicos con el aumento de la temperatura y en torno a la temperatura corporal (37°C). Este proceso en el que los polímeros presentan comportamiento sol-gel dependerá de la composición del solvente, variación de la temperatura, pH del medio y concentración de iones. Es así que este tipo de hidrogeles se pueden clasificar en dos tipos:

- Hidrogeles termosensibles positivos, que por encima de una temperatura se encuentran en el estado sol y su gelificación se produce en el proceso de

enfriamiento, cuando se alcanza la denominada UCST (*Upper Critical Solution Temperature*).

- Hidrogeles termosensibles negativos (como el caso de los copolímeros de PEO-PPO de la presente tesis), que por debajo de una temperatura se encuentran en el estado sol y su gelificación se produce en el proceso de calentamiento, cuando se alcanza la denominada LCST (del inglés *Lower Critical Solution Temperature*). Este fenómeno también se conoce como Gelificación Térmica Inversa o Reversa (RTG, del inglés *Reverse Thermal Gelation*).

Durante las últimas décadas han adquirido especial importancia los hidrogeles inyectables, que permiten la formación del hidrogel *in situ*. La inyección es una técnica mínimamente invasiva que resulta favorable por su fácil administración y la mínima incomodidad que causa en el paciente. Por otra parte, la inyección del hidrogel en el lugar de implantación permite una mejor adaptación del andamiaje al tejido circundante.

Los hidrogeles termosensibles negativos constituyen uno de los materiales más adecuados para el desarrollo de biomateriales inyectables (37-45). Para las aplicaciones biomédicas de estos hidrogeles termosensibles inyectables, la LCST debe ser próxima a la temperatura fisiológica, permitiendo la inyección del precursor del hidrogel en el estado sol a baja temperatura y su gelificación a temperatura corporal.

Por otro lado, debido a las estructuras de tamaño nanométrico obtenidas a partir de dichos polímeros (57, 35-42), estos sistemas pueden presentar una acumulación y retención mejorada/potenciada en tumores sólidos, debido al aumento y alteración de vascularización (efecto EPR) (ver **Figura 4**) (36, 58, 59).

En la misma dirección, es que en la presente tesis doctoral se han investigado y estudiado copolímeros de bloque prístinos, a base de PEO-PPO anfífilas autoensambladas y sus derivados glucosilados (37-42, 57) (modificadas con

azúcares), presentados como posibles agentes candidatos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama.

La modificación con glucosa se postula por su potencial acumulación en el tumor debido a una mayor captación celular de las micelas conjugadas a glucosa a expensas del aumento exacerbado del metabolismo de dicho azúcar en las células tumorales y sobreexpresión de GLUTs (37-42, 50).

1.2.1.3. Preparación de MPs para aplicaciones biofarmacéuticas

La forma de preparación de MPs depende de las características fisicoquímicas del copolímero implicado (como ya se describió), así como del principio activo (PA)/fármaco. En este sentido, se pueden diferenciar dos grandes clases según los procedimientos para encapsular fármacos (ver **Figura 7**).

La primera clase (1) comprende métodos de disolución directa, la cual implica la solubilización del copolímero en medio acuoso a 4 °C durante toda la noche y el posterior agregado de fármaco sólido, de baja solubilidad acuosa en exceso, y agitación mecánica por 48 h, con la consiguiente filtración del fármaco no encapsulado utilizando filtros de 0.22-0.45 micrones (ver **Figura 7A**). Este último, es el procedimiento más empleado por el grupo actualmente liderado por la Dra R. Glisoni (Nanobiotec UBA-CONICET, Argentina) para la formulación de los copolímeros como los poloxámeros y poloxaminas, anteriormente mencionados, los cuales han sido seleccionados para este desarrollo.

La segunda clase (2) de preparación se refiere a micelas derivadas de copolímeros anfífilicos y fármacos que no son fácilmente solubles en H₂O y/o donde la clase 1 de preparación no resultó efectiva, en donde los solventes orgánicos utilizados (DMSO, DMF, acetonitrilo, THF) solubilizan tanto al copolímero como a la sustancia activa a encapsular (ver **Figura 7**). En este caso toma relevancia la forma en la que se remueve el solvente (ver **Figura 7 B-E**). Para aquellas preparaciones en la que el solvente es miscible con agua,

la mezcla a base de copolímeros y fármaco puede ser dializado contra agua, por lo que el lento retiro de la fase orgánica favorece la micelización y encapsulación (ver **Figura 7B**) (38). Otra estrategia de obtención es la evaporación de la fase orgánica hasta la obtención de una dispersión coloidal de MPs cargadas con fármaco (ver **Figura 7C**) o hasta la obtención de un film polimérico, en donde las interacciones polímero-fármaco se ven favorecidas (ver **Figura 7D**). Posteriormente se re-hidrata el film con solventes acuosos a temperatura ambiente, produciéndose micelas cargadas con fármaco (ve **Figura 7D**). Por último, cabe destacar que es posible la encapsulación de moléculas en MPs por una simple dispersión en H₂O y posterior congelamiento-liofilización (ver **Figura 7E**) (38, 40, 41, 42).

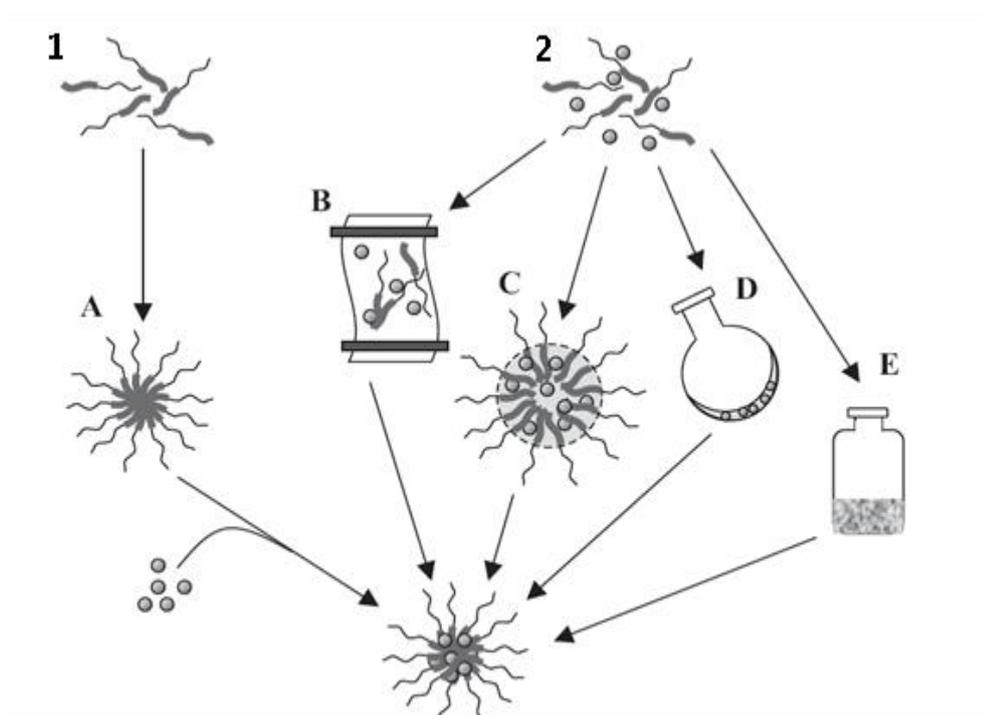


Figura 7. Esquema ilustrativo general de los métodos más ampliamente usados para el encapsulamiento de fármacos. Adaptado de 38. A-Equilibrio simple, B-Diálisis, C-emulsión sustancia orgánica/agua, D-disolución fundida y E-secado por congelación.

Actualmente también se emplea un procedimiento que combina ambos métodos (1 y 2) y el cual consta de un único paso que está basado en la disolución del polímero y el fármaco en *tert*-butanol y H₂O (TBA), seguido de una liofilización.

Las micelas con el fármaco se forman espontáneamente luego de una reconstitución del polímero liofilizado. Es importante destacar que se ha reportado la encapsulación de dos agentes anticancerígenos como paclitaxel y docetaxel, entre otros, empleando este método (40).

Asimismo se deben caracterizar dichas nanoestructuras a partir de diversas técnicas complementarias para determinar: CMC, tamaño hidrodinámico promedio, distribución de tamaños, potencial Zeta de superficie, estabilidad física, liberación del fármaco *in vitro*, entre otras propiedades, las cuales se detallan algunas en la siguiente **Tabla 2**:

Técnica empleada	Información
DLS (60, 61)	Distribución de tamaño/s, z-pot promedio, CMC, carga superficial.
DSC (62)	Rigidez de membrana, temperaturas de degradación, parámetros de estabilidad, presencia y/o liberación de fármacos, entre otros.
RAMAN (63)	Medida de diámetro, calidad del material, imagenología, entre otros.
TEM(64)	Tamaño, estructura interna y externa, entre otros.
AFM(65)	Topografía de la muestra en tres dimensiones.
Cromatografía (66, 41, 42)	Identificación de componentes, determinación del peso molecular, entre otros.
RMN(42, 67, 68)	Elucidación estructural, interacciones moleculares, entre otros.

Tabla 2. Resumen de las técnicas más empleadas reportadas para la caracterización de nanoestructuras.

1.2.1.4. Biodistribución de las MPs

Es necesario que las MPs permanezcan más tiempo en la circulación (8), por lo que es necesario formular diversas MPs que presenten una corona de polietilenglicol (PEG), lo que se conoce como pegilación, que previene la unión de opsoninas séricas y el reconocimiento por el SFM (26, 51, 53) una vez encontradas en el torrente sanguíneo, lo cual disminuiría las oportunidades de ingreso al tumor. Es debido a esto, que las MPs a base de copolímeros dibloque o tribloque de PEO-PPO poseen la ventaja de ser sistemas estéricamente estabilizados que evitan y/o retrasan el fenómeno de opsonización (internalización por macrófagos), proporcionando una mayor semivida plasmática en circulación.

En cáncer, es de gran interés el desarrollo de MPs permanezcan más tiempo en la circulación, para que los fármacos que pudieran contener entren y se liberen en el tumor por el efecto EPR antes mencionado (ver apartado 1.2.1.2.).

En este sentido una de las estrategias empleadas en la presente tesis, consiste en derivatizar las MPs con azúcares como derivados de glucosa. De tal forma, se le otorgaría la posibilidad de ser captados de manera específica por los tumores, ya sea por receptores o transportadores sobre expresados en sitios blanco (69, 70). Lo que reduciría la internalización inespecífica de fármacos presentes en las MPs, reduciendo los efectos adversos asociados (71).

1.2.2. Liposomas termosensibles estéricamente estabilizados o pegilados

En la actualidad, existe un gran interés por el desarrollo de nanosistemas sensibles a estímulos (como temperatura, pH, luz, campo magnético, ultrasonido, entre otros). Se busca que, con el estímulo como disparador, se produzca un proceso de desintegración sitio específico de la nanoestructura y la consiguiente liberación del principio activo transportado en dicho sistema. En este contexto es que planteamos la propuesta de estudiar liposomas

preformados comerciales mezclados a copolímeros termosensibles formadores de MPs.

Teniendo en cuenta este escenario, fármacos hidrofóbicos encapsulados en MPs a base de copolímeros sensibles a la temperatura a altas concentraciones (como poloxámeros y/o poloxaminas) y mezclados con liposomas preformados y pegilados, podrían ser usados para el control eficaz de la liberación del fármaco, teniendo en cuenta la capacidad de gelación térmica de estos materiales, ya mencionada (ver apartado 1.2.2.2.) (72, 73).

1.3. Problemática actual en el uso de antitumorales: resistencia de las células tumorales a la terapia convencional en condiciones de hipoxia tumoral

La resistencia de los tumores sólidos a la radioterapia recomendada, según el tipo de tumor, es atribuida al microambiente y respuesta a la hipoxia, entre otras. En este sentido, la presencia de oxígeno es lo que confiere la sensibilidad a las radiaciones ionizantes y de allí el extenso uso de la técnica radioterapéutica para el abordaje clínico de diversos tipos de tumores, como el cáncer de mama (ver **Figura 8**). *In vitro* se ha observado que las células expuestas a radiaciones ionizantes generan una de las lesiones más importantes, a través de reacciones radicalarias en el ADN.

A pesar de que la hipoxia tumoral es un problema al conferir resistencia a las terapias antitumorales actuales, en ciertas circunstancias, puede ser visto como una ventaja. En este sentido, la hipoxia está confinada en el tumor sólido y por lo tanto representa un blanco que puede ser explotado para eliminar selectivamente las células tumorales en los tumores sólidos (74).

La idea de utilizar la hipoxia para una mejor ventaja terapéutica fue inicialmente propuesta por Lin en 1991 (74, 75), quien planteó que los fármacos que poseían quinonas en su estructura eran más citotóxicos en condiciones de hipoxia (76-78). Posteriormente, otros grupos demostraron que el metronidazol,

misonidazol, nitroimidazoles (de uso como radiosensibilizadores), eran citotóxicos hacia células tumorales en cultivos celulares. Esto llevó al desarrollo de un grupo especial de agentes citotóxicos conocidos como citotoxinas selectivas en hipoxia (76, 77).

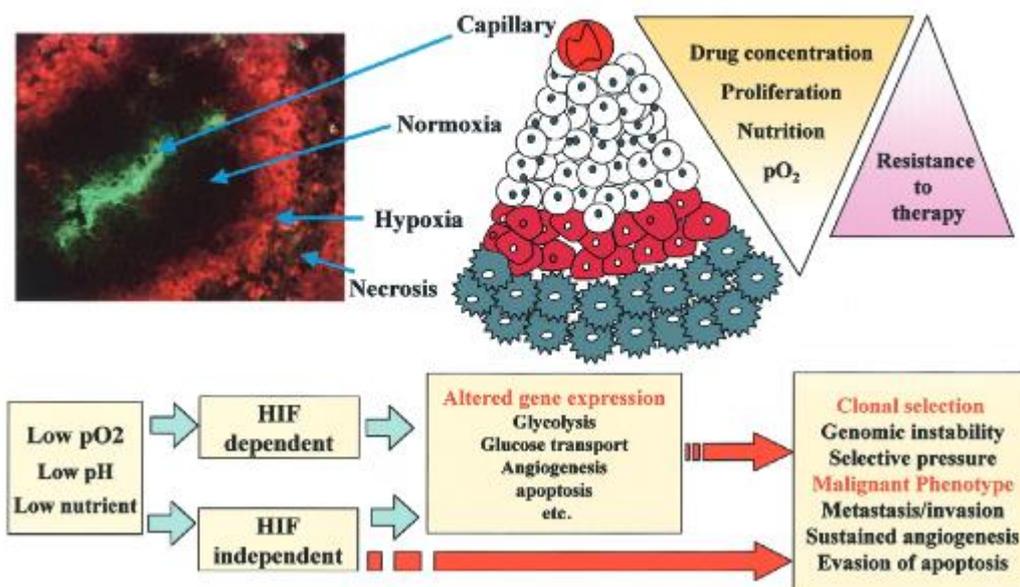


Figura 8. Representación de la hipoxia en tumores sólidos. Se muestra una sección del tumor de colon humano (HCT116) tratado con un anticuerpo contra CD31 (en verde) y con pimonidazol (en rojo). Además, se esquematiza la proliferación celular y todos los parámetros que se ven alterados en el ambiente tumoral. Adaptado de 78.

1.3.1. Profármacos bio reducibles en hipoxia

Los profármacos bio reducibles son compuestos antitumorales que se bio reducen, particularmente en condiciones de hipoxia, por lo que son capaces de activarse a través de un metabolismo reductivo irreversible, generando especies potencialmente dañinas para las células hipóxicas. Esta selectividad se debe al grado de hipoxia del tejido en cuestión y al elevado nivel de enzimas reductoras del tejido, por ejemplo, NADPH: citocromo P450 reductasa, citocromo P450, xantinoxidasa, DT-diaforasa y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

Estos agentes, por las características expuestas, son atractivos como fármacos antineoplásicos por su selectividad hacia tumores sólidos, que poseen una alta proporción de tejido hipóxico. En este sentido, ya han sido descritos diversos fármacos con estas características y algunos de ellos se encuentran en estudios de fase clínicas II y III (**79-81**).

Desde el punto de vista químico pueden ser clasificados dentro de alguna de las siguientes familias: nitro-derivados, derivados de quinonas y **derivados de N-óxido**, entre otros.

1.3.2. Derivados de N-óxido de fenazina

Reportes actuales revelan que la hipoxia juega un papel importante en la progresión del cáncer y la metástasis en humanos, incluyendo metástasis del cáncer de mama, entre otros (**82-84**). Además, el metabolismo tumoral alterado y las enzimas reguladas por el factor 1a hipoxia (HIF-1a), son vitales para el proceso de progresión tumoral, angiogénesis y metástasis (**84-86**).

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado y descrito derivados de 5,10-dióxido de fenazina (ver **Figura 9D**), como agentes selectivos en condiciones de hipoxia del cual surgieron líderes para tratar tumores sólidos.

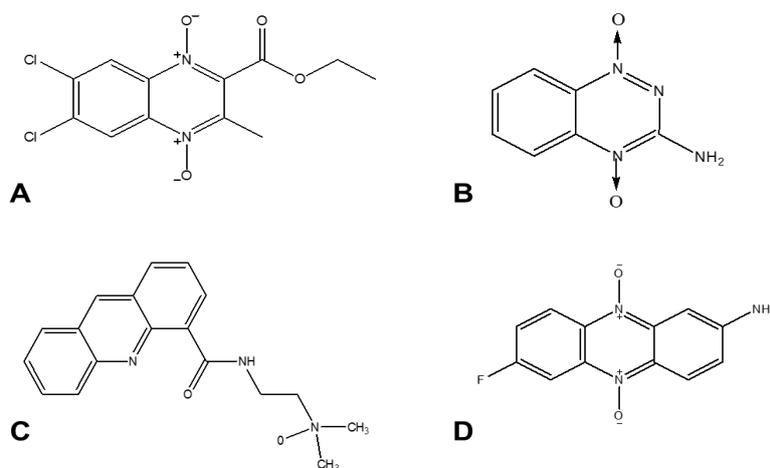


Figura 9. Derivados N-óxido descritos: ejemplo de una quinoxalina (A) (**81,85**), Tirapazamina (B), DACA (C) (**86**) y 5,10-dióxido de 2-amino-7(8)-fluorofenazina (D). Algunos ya se encuentran en estudios de fases clínicas para su uso en humanos.

La función *N*-óxido es un grupo funcional que resulta de la adición de un átomo de oxígeno al par de electrones solitario de un átomo de nitrógeno. Esta función está presente en un tipo de compuestos, como los *N*-óxido de aminas terciarias y aromáticas.

En tumores hipóxicos, la sobreexpresión de enzimas reductasas participan posibles procesos de acción biológica por actuar a nivel de compuestos con estas funciones *N*-óxido. Particularmente cuando el *N*-óxido es bio-reducido en un proceso vía un electrón, se genera un metabolito citotóxico, el radical nitróxido; si la metabolización es por reducción de los *N*-óxido de las aminas (por captura de dos electrones) conduce a las respectivas aminas, generándose un agente que podría interaccionar con biomoléculas.

En el entorno hipóxico, la forma reducida se transformaría en una entidad capaz de establecer interacciones electrostáticas, y que por la consecuente protonación, promueva que el agente citotóxico quede confinado exclusivamente en el tejido enfermo en pH ácido del microambiente de las células tumorales.

Por todo lo antes expuesto, su selectividad en hipoxia es considerada como el resultado de un incremento en la afinidad por biomoléculas (ADN y ARN polimerasas y topoisomerasas o ambas), lo que le permitirá actuar como agentes citotóxicos en tumores sólidos (87–90).

Derivados de fenazinas, como el compuesto 5,10-dióxido de 2-amino-7(8)-fluorofenazina (FNZ) (ver **Figura 9 D**), presentan baja solubilidad acuosa que impide su acción selectiva a nivel tumoral, su administración oral, parenteral y transdérmica.

Es así que se vería restringido su uso clínico, debido a la baja biodistribución los medios acuosos del organismo para su potencial acción en condiciones de hipoxia.

1.4. Diseño y desarrollo de nuevos candidatos a fármacos

El desarrollo de un nuevo fármaco se presenta como un proceso de varias etapas:

- ✓ Fase de descubrimiento
- ✓ **Fase preclínica**
- ✓ Fase clínica (humanos)
- ✓ Fase de aprobación y registro
- ✓ Fase de desarrollo químico farmacéutico

Dicho proceso es muy largo y costoso, en el cual se demostrará en distintas etapas que el nuevo fármaco presenta los requisitos de eficacia, seguridad y calidad para su comercialización y administración a humanos (**91**).

A continuación, se describirá la fase preclínica como etapa clave en el desarrollo de potenciales fármacos.

1.4.1. Ensayos preclínicos

El desarrollo preclínico de un potencial fármaco hace referencia al conjunto de estudios de eficacia y seguridad de fármacos/PA que se deben realizar en sistemas biológicos diferentes al modelo del ser humano. Existen determinados estudios que se describen para dicho fin que deben realizarse antes de comenzar las pruebas en humanos (fases clínicas) (**92**). El objeto de la fase preclínica es caracterizar la eficacia y seguridad del medicamento in vivo (en animales de experimentación) o sistemas in vitro. Se presenta como un requisito indispensable para proceder a ensayos en humanos, la presentación de los datos obtenidos, para la autorización por parte de las entidades reguladoras.

El desarrollo preclínico comprende una fase inicial de selección de los nuevos candidatos a fármacos, investigación de su potencial acción y finalmente de la evaluación de su seguridad (ver **Figura 10**). La clave del éxito es que las moléculas candidatas posean ciertas propiedades favorables: actividad

biológica y solubilidad adecuada, capacidad para atravesar barreras críticas, estabilidad metabólica adecuada y seguridad en su administración (**92-94**).

Cada fármaco particular necesita su propio desarrollo preclínico debiendo tenerse en cuenta diversos factores: tipo de fármaco, mecanismo de acción e indicaciones clínicas. Es especialmente importante conocer el ámbito regulatorio y las guías que aplican. En este sentido es fundamental contemplar dónde se va a realizar el desarrollo clínico, ya que los requisitos regulatorios pueden diferir. Por ejemplo, en ciertas ocasiones, los requisitos en EEUU por la agencia FDA y la European Medicines agency (EMA) presentan variaciones (ver **Figura 10**).

Es importante para definir el desarrollo preclínico, tener claro el objetivo “clínico” para implementar una correcta duración del tratamiento, vía y pauta de administración, tipo de población sujeta a estudio, etc (ver **Figura 10**). En este sentido la OECD emite guías muy específicas acerca de cómo llevar a cabo los estudios preclínicos de seguridad (**95**). Estas guías están enfocadas a la evaluación de sustancias químicas (en general) con muy diversas aplicaciones. En la mayoría de casos, las recomendaciones que establecen son aplicables también a fármacos, por lo que habitualmente a la hora de diseñar un estudio preclínico generalmente se hace referencia a estas guías de la OECD (**96**).

Las directrices de la OECD para la evaluación de productos químicos son una compilación de los ensayos utilizados más relevantes acordados internacionalmente, tanto por los laboratorios del gobierno como por la industria, para evaluar la seguridad de los productos químicos (ver **Figura 10**).

Por otra parte, la OECD es el organismo que ha emitido una serie de guías o directrices acerca de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs). Estas guías se consideran de referencia para la implementación de las BPLs en los laboratorios preclínicos, así como el seguimiento y la ejecución de los ensayos preclínicos de seguridad (**91**).



Figura 10. Esquema representativo de las grandes etapas: descubrimiento, fase preclínica y fase clínica en el desarrollo de fármacos (91).

^aAbsorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME), se utiliza para describir la disposición de un compuesto farmacéutico en el organismo ^bdel inglés, HIT to LEAD, indica que se logra un compuesto exitoso luego de un estudio de una colección de resultados, mediante el refinamiento de los criterios de selección, que permite encontrar las moléculas prometedoras para un futuro desarrollo. ^cIND, Investigación de Nuevas Drogas, de sus siglas en inglés Investigational New Drug ^dIMPD, Dossier de Producto Médico en Investigación en inglés Investigational Medicinal Product Dossier.

1.4.1.1. Ensayos de toxicidad *in vitro* -Test de AMES-

El ensayo de Salmonella-fracción microsomal (o más conocido como test de AMES) es un ensayo biológico *in vitro*, que permite evaluar el potencial mutagénico de una sustancia química o biológica, a partir de su capacidad de producir mutaciones de ADN en bacterias.

Es una de las formas de evaluar la genotoxicidad de nanomateriales en cepas de *Salmonella*. Dicho test es uno de los reportados y recomendados por la OECD y la farmacopea para detección de mutagenicidad de diversos materiales, incluso para MPs (**97-101**).

Dicho test se caracteriza por realizarse en un conjunto de cepas de *Salmonella typhimurium* (*Salmonella enterica subsp. Enterica*) auxótrofas para el operón de histidina, con distintas mutaciones (blancos de mutágenos), que incluyen TA98, TA100, TA1535, TA1537 y TA102 (ver **Tabla 3**).

Cada una de estas cepas presenta una mutación diferente en el operón de histidina, siendo todas con fenotipo His- (ver ejemplos **Tabla 3**). Es decir, carecen de la capacidad de síntesis de una enzima de la vía metabólica de la histidina, convirtiéndose en dependientes de dicho aminoácido para su crecimiento.

Además de las mutaciones para histidina, existe una mutación rfa que implica la pérdida parcial del lipopolisacárido de la pared, lo que aumenta la permeabilidad de la misma a ciertas moléculas.

Estas mutaciones, aumentan la capacidad de dichas cepas en el reconocimiento de mutágenos, actúan como “hot spots” para agentes mutagénicos que producen daño genético.

Asimismo, otra diferencia entre las diferentes cepas, es la presencia (en algunas de ellas) de plásmidos de resistencia a ciertos antibióticos. El pKM101 aumenta la mutagénesis química e inducida por UV, además, es capaz de aportar resistencia a ampicilina (ver **Tabla 3**). Otro plásmido, el pAQ1, confiere resistencia a tetraciclina y amplifica los sitios de acción del mutágeno. Mientras que el Δ uvrB, elimina el mecanismo de reparación del ADN por escisión y hace que la bacteria sea dependiente de biotina (ver **Tabla 3**).

Cepa	Mutación operón histidina	Δ uvrB	Defecto en LPS	Plásmido	Secuencia blanco	Reversión
TA98	hisD3052	Mutado Delecion	Rfa	pKM101	C-G-C-G-C- G-C-G	Cambio marco de lectura
TA100	hisG46	Mutado Delecion	Rfa	pKM101	G-G-G	Sustitución de un par de bases
TA1537	hisC3076	Mutado Delecion	Rfa	No presenta	C-C-C	Cambio marco de lectura
TA1535	hisG46	Mutado Delecion	Rfa	No presenta	G-G-G	Sustitución de un par de bases
TA102	hisG428	Mutado Tipo salvaje	Rfa	pKM101, pAQ1	No específica	Transición/trans versión

Tabla 3. Resumen de las mutaciones implicadas en cada cepa, así como sus principales características y el operon de histidina involucrado que se vera afectado que implicara la no producción de HIS.

En presencia de un agente mutagénico, la bacteria recupera la la variante “wildtype” del gen de su operón HIS, lo que resulta en la producción de histidina y la formación de colonias, lo que se conoce como "eventos mutagénicos positivos"(ver **Figura 11**) o “revertantes”. Mientras a que se darán “eventos mutagenicos negativos” cuando no son capaces de recuperar la concentración de HIS, ya que no presentan capacidad mutagénica, como se esperaría para un solvente empleado para la elaboración de nanovehiculos o el propio nanovehiculo (ver **Figura 11**).

Asímismo, la prueba de AMES puede emplear un activador metabolico (ya sea de humanos o animales), conocido como "preparacion S9" (ver en anexos composicion). Las preparaciones S9 presentan diversos reactivos como cofactores para su uso en estudios de activación metabólica se fabrican con rigurosos estándares de calidad y rendimiento.

Por lo que en general se analiza el crecimiento bacteriano en dos condiciones, con y sin activación metabolica S9 (**101**).

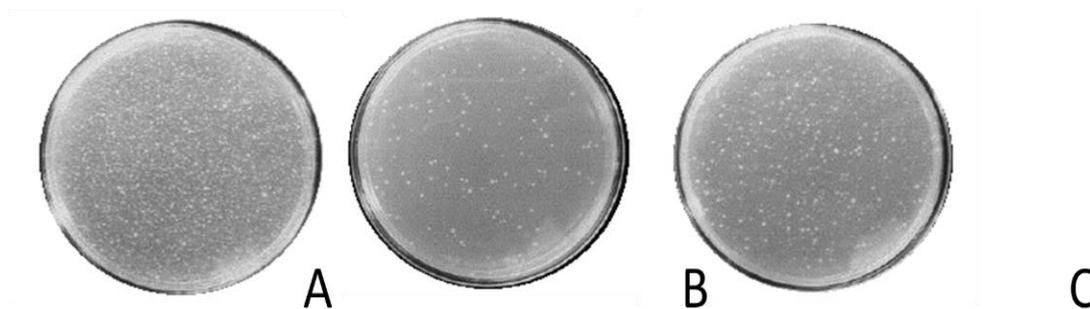


Figura 11. Imagen ilustrativa de un ensayo tipo en TA98, donde se observa el resultado de un control positivo (A), control negativo (B) y un compuesto que resulta mutagénico (C).

1.4.1.2. Ensayos de toxicidad *in vivo* -Modelo BALB/c normal y con tumor de mama inducido

Dentro de los modelos más ampliamente utilizado junto con el modelo NUDE, es el BALB/c normal (11,12, 102). En este sentido hay extensos reportes en los cuales viene siendo utilizado dicho modelo, para el estudio del cáncer de mama metastásico simil fase 4 humano. En dicho modelo, los mecanismos sensibles a la hipoxia modulan la hematopoyesis extramedular extensa (EMH) y la angiogénesis (103-106).

Este modelo ha mostrado ser **un modelo óptimo** "*in vivo*" que permite **predecir**, adecuado para **descubrir y cuantificar** el impacto que tienen los tratamientos pautados para el desarrollo del cáncer de mama en estadios más avanzados.

Por lo que se analizará si nanoformulaciones son capaces de curar la enfermedad, si la vuelve menos agresiva, y valora adecuadamente la toxicidad de las formulaciones planteadas en el desarrollo de la tesis (107). Dichos estudios, particularmente permiten analizar si estamos frente a potenciales nanofármacos.

Por lo tanto, analizar la toxicidad, distribución y respuesta tumoral de nano fármacos en dicho modelo animal con y sin inducción de cáncer de mama (el cual debe ser previamente caracterizado), aportará resultados que impactaran directamente en aporte a un mayor entendimiento de los procesos desencadenados a nivel fisiológico. Lo cual desencadenara, o no, en futuros ensayos clínicos en humanos.

Entre otros, dicho modelo esta descrito para diversos estudios como lo es: el estudio de toxicidad aguda y tratamientos con antitumorales.

1.4.1.3. Estudio de toxicidad aguda (Test del -Up and Down-)

Es la técnica empleada para la evaluación de fármacos en cuanto a su capacidad de generar efectos adversos o secundarios luego de su administración de acuerdo a la vía empleada (intraperitoneal, intradérmica, intravenosa, oral, etc). Dicho método permite la utilización de la menor cantidad de animales procurando la obtención de un resultado reproducible **(108)**.

Existen dos tipos de test, del inglés, "limit test" y "main test". El test límite, resulta adecuado y eficiente para identificar PA/fármacos que probablemente presenten baja toxicidad. En este procedimiento, los animales se dosifican una única vez, secuencialmente, en intervalos generalmente de 48 horas. Si el animal muere, se procede al "main test" donde se ensayarán progresivas dosis en base a si el animal sobrevive o muere **(108)**.

El procedimiento para la estimación de la LD₅₀ es generalmente a través de programas gratuitos como el AOT425, el cual ha sido desarrollado como complemento a la guía propuesta por la OECD 425 para los estudios de toxicidad aguda **(96)**.

1.5. Estrategias en el desarrollo de formulaciones nanotecnológicas conjugadas a radionucleídos

Los estudios de marcación pueden ser diversos, una de las técnicas de marcación más prometedora es con el empleo de emisores gamma, los cuales aportan en el diagnóstico e identificación de las distintas fases del desarrollo de un nuevo fármaco (109), entre ellas:

- 1- Imagenología *in vivo* para corroborar la interacción entre el nanosistema desarrollado y su blanco molecular.
- 2- Estimación de la biodistribución *in vivo* en órganos blanco y no blanco.
- 3- En la fase de el diseño de la nanoformulación, ya que la marcación con emisores gamma permite visualizar:
 - a- En la marcación de la biomolécula, el cambio en la distribución del fármaco libre al fármaco encapsulado.
 - b- En la marcación del nanosistema, corrobora la biodistribución de esta con respecto al fármaco marcado nanoencapsulado.

1.5.1. Estrategias de marcación con ^{99m}Tc de MPs y FNZ

Entre los radionúcleidos que se usan habitualmente en medicina nuclear para el radiomarcado de biomoléculas, el ^{99m}Tc ofrece grandes ventajas. Entre ellas, la ventaja de la seguridad y la fácil disponibilidad gracias a la presencia de generadores de uso clínico.

El ^{99m}Tc es un emisor puro gamma con periodo de semidesintegración de seis horas. El ^{99m}Tc es producto del decaimiento del ^{99}Mo , de acuerdo al esquema de decaimiento que se muestra en la **Figura 12**.

El $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (en forma de pertechnetato de sodio) es la forma química en la que el ^{99m}Tc se eluye del generador ^{99}Mo - ^{99m}Tc .

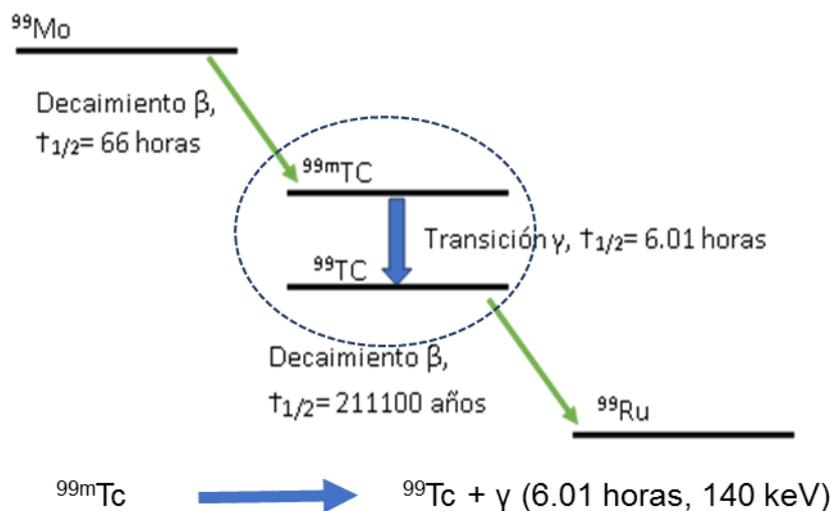


Figura 12. Esquema de decaimiento ^{99m}Tc a partir del ^{99}Mo .

Además, debido a sus propiedades químicas, puede coordinarse en un estado de oxidación estable mediante ligandos bi y tridentados representados por ligadores funcionales pequeños, como el ticarbonilo (110), ácido hidrazinonicotínico y el ácido nitrilotriacético; o por residuos aminoacídicos, como la histidina y la cisteína (12).

Dentro de las estrategias de marcado podemos distinguir: **marcado directo** y **marcado indirecto mediante el uso de los quelantes preformados**.

El marcado directo consiste en el uso de un agente reductor y la unión del ^{99m}Tc de manera eficiente formando enlaces ^{99m}Tc -biomolécula de interés.

El marcado indirecto consiste en el uso de un agente quelante bifuncional (AQB) que permite la una unión del ^{99m}Tc a la biomolécula. El empleo de quelantes preformados que consiste en la formación de un complejo de ^{99m}Tc con un AQB, el cual posteriormente se conjuga con la biomolécula, por ejemplo, liposomas o polímeros (110). La unión de los AQB puede ser realizada antes o después de la unión del ^{99m}Tc .

La obtención de la mayoría de los radiofármacos de ^{99m}Tc involucra la reducción del Tc (VII) a uno o más de los estados de oxidación menores. Bajo estos estados de oxidación el ^{99m}Tc es capaz de unirse a un gran número de moléculas orgánicas e inorgánicas bajo la forma de complejos de coordinación,

lográndose obtener compuestos marcados de aplicación en Medicina Nuclear conocido como radiofármacos.

Los radiofármacos se definen como una sustancia química que contiene átomos radioactivos en su estructura, y por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de la radiación emitida son adecuados para su administración en seres humanos, ya sea con fines diagnósticos y/o terapéuticos.

Las excepciones a este tipo de radiofármacos son el propio $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y el ^{99m}Tc -azufre coloidal en el cual el tecnecio mantiene su estado de oxidación, formando el $^{99m}\text{Tc}_2\text{O}_7$. Los estados reducidos de Tc pueden obtenerse por tratamiento de la disolución del ion pertechnetato con una gran variedad de agentes reductores, entre ellos HCl concentrado, mezcla de HCl-HI-KI ácido ascórbico y Sn^{2+} , entre otros.

De todos los sistemas de reducción, el más ampliamente usado y disponible en Uruguay para el marcado de radiofármacos con ^{99m}Tc es el ion estannoso (Sn^{2+}), en disolución acuosa, acida o no según el caso. Las ventajas que presenta, entre otras, son: baja toxicidad, buen poder reductor y posibilidad de efectuar el marcado de un gran número de moléculas con buen rendimiento. Se lo puede utilizar bajo la forma de haluro (cloruro o fluoruro) o bajo la forma de complejo con ligandos como tartrato, pirofosfato, etc (**111, 112**).

Una vez reducido a estos estados de oxidación menores, el ^{99m}Tc , es capaz de unirse a un gran número de moléculas orgánicas e inorgánicas bajo la forma de complejos de coordinación.

En este sentido, cuando un radionucleído como el ^{99m}Tc se incorpora a una molécula más compleja, proceso que se conoce como marcación, da lugar a un radiofármaco o biomolécula marcada (**113**). En el proceso de marcación de ^{99m}Tc se pueden obtener una mezcla de estados reducidos del ^{99m}Tc . De esta forma es relevante controlar las condiciones de reacción de modo de obtener la mayor proporción de la especie de interés. En la marcación de ^{99m}Tc es deseable que un alto porcentaje de actividad se encuentre en la forma química de interés, en relación a la actividad total presente de dicho radionucleído.

Es importante destacar que el complejo tricarbonílico con ^{99m}Tc es uno de los más empleados en medicina nuclear. Consiste en un core de Tc en estado de oxidación +1 y está rodeado de tres carbonilos, formando una estructura compacta y casi de forma esférica. Si se completa la esfera de coordinación (octaedro) cerrando con tres ligantes adecuados, el centro metálico queda protegido de posibles oxidaciones y ataque de ligantes. En presencia de agua, se forma un triacuocarboniltecnecio (I), muy estable en un amplio rango de pH **(114)**.

La obtención de $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ puede ser obtenida a partir del empleo de carboboranos como reductor y fuente de grupos CO in situ, utilizando borohidruro de sodio como reductor en presencia de (CO)g, o a partir de kits disponibles comerciales por ejemplo Isolink (boranocarbonato) **(115)**, entre otros. Los cuales permiten la síntesis de $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, de buena estabilidad y almacenamiento adecuado para su aplicación en radiofarmacia.

A dicho complejo se le llama precursor ya que las moléculas de H_2O (inestables) del complejo carbonílico formado tienen una K_d adecuada para ser sustituido total o parcialmente por varios ligantes bi y tridentados para marcar moléculas proteicas, aminas aromáticas, amidas, fosfinas, entre otros.

Por lo se pretende radiomarcarse fármacos como la FNZ, la cual ha sido reportada a través de tricarbonilo **(109)**. Para su posterior encapsulación en MPs, mezclas de MPs y MPs derivatizadas con Glu, aprovechando dicha funcionalización como targeting activo **(41, 42)**.

Los recientes avances en nanobiotecnología han llevado al desarrollo de nanomateriales que pueden albergar diversas funcionalidades y ser cargadas con fármacos terapéuticos, lo que permite el diagnóstico y tratamiento simultáneos de diferentes tipos de cáncer humano **(116-118)**.

Dichas estrategias fueron exploradas para la mejora de la acción del fármaco con el fin de diagnosticar y tratar cáncer de mama, pero que podría ser empleado en otros tipos de cáncer.

1.5.2. Vías de Administración de ^{99m}Tc -MPs

La administración de ^{99m}Tc -MPs se determina según las MPs unidas (propiedades fisicoquímicas, concentración de fármaco para lograr el efecto terapéutico, entre otros) en relación el “target” de diagnóstico. En este sentido, la inyección intravenosa es la más utilizada para la administración de radiofármacos en medicina nuclear en cuanto a su biodisponibilidad, farmacocinética, tiempo de circulación, entre otros (**118**). Particularmente se promueve una mayor vida media en circulación, generando una oferta mayor de sistemas desarrollados nanoestructurados (**109, 117**).

En la presente tesis se exploró esta vía para la inyección de los ^{99m}Tc -MPs y los encapsulados MPs con $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$.

2. Objetivo general

Diseño, síntesis, caracterización y evaluación biológica de materiales nanoestructurados con derivados de 5,10-dióxido de fenazina para su aplicación en oncología.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1 Preparación y determinación de la solubilidad intrínseca de la FNZ.

2.1.1.1. Optimización de la síntesis

2.1.1.2. Determinación de la solubilidad

2.1.2 Síntesis y caracterización fisicoquímica de las nanoestructuras a ser utilizadas para encapsular FNZ.

2.1.2.1. Preparación

2.1.2.2. Determinación de tamaño

2.1.3 Síntesis y caracterización fisicoquímica de las nanoestructuras con FNZ.

2.1.3.1. Estudios de solubilidad

2.1.3.2. Estudios de estabilidad y liberación

2.1.3.3. Determinación de tamaño

2.1.4 Evaluación biológica de nanoestructuras con FNZ.

2.1.4.1. Estudio de la mutagenicidad de las nanoformulaciones vacías y con FNZ encapsulada

2.1.4.2. Estudios de toxicidad aguda en ratones BALB/c de las nanoformulaciones vacías y con FNZ encapsulada

2.1.4.3. Evaluación de la actividad *in vivo* de las nanoformulaciones/nanosuspensiones de FNZ que resultaron con mejor perfil de estabilidad y baja toxicidad

2.1.5 Síntesis y caracterización fisicoquímica y biológica de complejos FNZ radionucleido para uso como agente de diagnóstico de cáncer de mama.

2.1.5.1. Estudios de estabilidad en medios biológicos.

2.1.5.2. Biodistribución en animales sanos de complejos $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$

2.1.5.3. Biodistribución en animales portadores de tumor mamario de los complejos $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

Pluronic® 127 (127; peso molecular: 12600 g/mol; contenido de PEO 70% en peso) y Tetronic® 1307 (T1307; peso molecular: 18000 g/mol; contenido de PEO 70% en peso) fue suministrado por BASF Corporation (Mount Olive, NJ, EE. UU.) Y utilizado como se recibió. Trietilamina, n-hexano, dicloruro de metileno, CDCl_3 , dimetilformamida anhidra, 2-etilhexanoato de estaño (II) ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, 95%), D_2O , solución salina tamponada con fosfato (PBS), $\text{SnF}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, etanol, solución salina, piridina, ácido acético, se adquirieron todos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

El suero bovino fetal (FBS) y el medio RPMI se adquirieron de Capricorn Scientific (Alemania). Los disolventes orgánicos se secaron sobre CaH_2 y se almacenaron con tamiz molecular (4Å). El agua fue purificada y desionizada (18 $\text{M}\Omega/\text{cm}^2$) en un sistema de filtración de agua Milli-Q (Millipore Corp., Milford). Se compraron generadores de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de TecnoNuclear (Argentina).

El avance del radiomarcado y la calidad del producto fueron seguidos por radio detección de TLC (ITLC) en tiras de gel de sílice (Pall Corporation, Port Washington, NY) y por cromatografía HPLC de fase inversa (RP-HPLC) (Agilent 1200 Series Infinity Star, Santa Clara-EE.UU.) con una columna Kinetex C-18 de 5 μm (Phenomenex) con solución acuosa solución de ácido trifluoroacético al 0.05% (solvente A) y acetato de etilo / ácido trifluoroacético 0.1% (solvente B) y se analizó por detecciones UV y gamma.

Todos los disolventes empleados fueron de calidad analítica y se emplearon sin ningún otro tipo de purificación.

3.2. Métodos

Dados los promisorios resultados obtenidos por parte del grupo de investigación en derivados con potencial actividad antitumoral (**119-129**) es que se planteó un escalado de la síntesis del compuesto FNZ para la posterior encapsulación en nanovehículos, para lograr un aumento en la solubilización y concentración de FNZ.

Para mejorar la biodisponibilidad de la FNZ, se han desarrollado varios abordajes, dentro de los que podemos mencionar:

- ✓ El empleo de sustancias como surfactantes a base de SF:TWEEN 80
- ✓ Desarrollo de nanopartículas de FNZ
- ✓ El empleo de complejos fosfolipídicos de FNZ.
- ✓ El empleo de análogos estructurales de FNZ.
- ✓ **La encapsulación de FNZ en MPs y MPs mezclas con liposomas.**

Para ello, se plantea el diseño, síntesis y caracterización de diversas nanoformulaciones de FNZ para ensayos *in vitro* e *in vivo*.

3.2.1. Síntesis de 5,10-dióxido de 2-amino-7(8)-fluorofenazina (FNZ) a mayor escala y determinación de solubilidad intrínseca en H₂O

Se procedió a la síntesis de **FNZ** según Lavaggi y col. con leves modificaciones (**80, 121, 123**). Se masó 4-fluoro-2-nitroanilina (2 g, 13 mmol) y se la solubilizó en 143.0 mL de MeOH en agitación con baño de hielo durante 10 minutos.

Luego, se agregó 21.5 mL de una disolución acuosa de hidróxido de sodio (50 %), gota a gota y una disolución de hipoclorito de sodio (6-14 % de cloro activo, 86.0 mL). Posteriormente, se agregó 44.0 mL de una disolución acuosa de ácido clorhídrico (50 %) hasta pH 5.5-6.0 y la anilina sin reaccionar se separó por filtración.

A la disolución (ya filtrada) se le añadió 30.0 mL de H₂O y se extrajo con AcOEt (3 x 80.0 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó en evaporador rotatorio y el aceite obtenido se liofilizó durante 48 h.

Se obtuvo 1.68 g de 5-fluorobenzofuroxano, como un sólido amarillo anaranjado (85 %).

Posteriormente, se colocó 5-fluorobenzofuroxano (5 g, 32 mmol), *p*-aminofenol (2.83 g, 26 mmol) y DMF anhidra (8.0 mL) en un balón de tres bocas, bajo atmósfera de nitrógeno y en un baño de hielo. La mezcla se agitó durante 10 minutos.

Posteriormente, se añadió Et₃N (4.5 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Después se colocó la mezcla de reacción a -20°C por 24 horas y luego se añadió *n*-hexano (10.0 mL). El precipitado resultante se filtró, se lavó con Et₂O (2 x 4.0 mL). El sólido resultante se liofilizó durante 48 h.

El sólido marrón oscuro, 5,10-dióxido de 7-fluoro-2-aminofenazina, se obtuvo con un **rendimiento de 56 %** (3.6 g) y fue caracterizado espectroscópicamente por RMN (H¹, ¹³C). (**129**).

3.2.2. Curva de calibración de FNZ por espectrofotometría para determinación de solubilidad intrínseca en H₂O y en MPs

Para la construcción de la curva de calibración del fármaco, se partió de concentraciones conocidas de FNZ (obtenido a partir de la síntesis descrita en el apartado anterior) y se prepararon 5 concentraciones comprendidas en un rango de 2.5-12 µg/mL de DMSO. Las mismas fueron colocadas en una cubeta para su posterior medición en el espectrofotómetro, en el cual se realizó un barrido, y se elaboró una curva con las medidas de absorbancia a una longitud de onda de 296 nm (el cual fue determinado a partir de un barrido en el espectro UV-VIS del fármaco).

Se utilizó como blanco DMSO y se obtuvo una ecuación de la recta a partir del promedio de tres curvas realizadas con tres madres diferentes de FNZ (2 mg/mL) y sus diluciones, según se describió anteriormente, teniendo en cuenta cumplimiento de la ley de Lambert–Beer (ver **anexos, solubilidad de FNZ en agua**).

Ecuación de la recta y: $ax + b$

3.2.3. Síntesis y caracterización de MPs conjugadas con Glu (T1307-Glu y F127-Glu) por RMN y FTIR

Los polímeros modificados con Glu se sintetizaron como se informó por Glisoni et al. (42) para F127 y con modificaciones para la obtención de T1307-Glu a escala de 10 g.

La técnica modificada empleada para la conjugación de gluconolactona a los OH de T1307 y F127 (ya reportada) se realizó utilizando la técnica de apertura de anillo asistida por microondas. Dicha reacción se realizó en presencia de octanoato de estaño con una frecuencia de radiación de 2.45 GHz, potencia 900 W y potencia 100.

Se masó T1307 (10.0 g), gluconolactona (440 mg, exceso molar del 10 %) y se disolvieron en DMF anhidra (15 mL) bajo agitación magnética con octanoato de estaño (200 μ L, relación molar 1: 1 de T1307 y Glu). La mezcla se realizó en un matraz de fondo redondo se colocó en el centro del horno de microondas y conectado al condensador (42, 54). La mezcla de reacción se expuso a las siguientes condiciones: (i) 5 minutos a potencia 30 W y (ii) 10 minutos a potencia 10 W. El tiempo total de reacción fue de 15 minutos.

Finalmente, la disolución de reacción se diluyó en H₂O (en proporción 1:2), y se dializó en H₂O por 4 días con frecuentes intercambios de H₂O del medio (cada 24 horas los primeros dos días) para eliminar Glu sin reaccionar y sus productos secundarios. Luego, se filtró la disolución por filtros de nitrocelulosa de 0.45 μ M, se congeló a -20°C por 24 h, luego se colocó 1 hora en freezer a -

80°C y posteriormente se liofilizó a temperatura del condensador de 45°C y 30 mbar de presión por 72 h. El T1307 pristino y T1307 glucosilado (T1307-Glu), fueron almacenados a -20°C hasta su posterior caracterización por espectroscopia RMN (^1H y ^{13}C) y FTIR a temperatura ambiente. El espectro de RMN se realizó en el equipo Bruker de 600 MHz de la Facultad de Ciencias-UdelaR (Bruker ADVANCE III 600 MHz, EEUU), se analizó ^1H y ^{13}C de T1307 (n=2) y T1307-Glu (n=2) en disoluciones de DMSO deuterado al 20 % p/v y los espectros se obtuvieron usando el software MestReNova 8.0.

Así mismo se caracterizó por espectroscopía FTIR usando un espectrómetro Nicolet 380 de la Universidad de Buenos Aires (UBA) (Kit de combinación Avatar, Smart Multi-Bounce HATR con reflejo de cristal ZnSe 458, Is50FTIR, Thermo Scientific, Madison, WI, EE. UU.) en el rango entre 4000 y 400 cm^{-1} (32 escaneos, resolución espectral de 4 cm^{-1}). Las muestras sólidas (T1307-Glu y T1307 pristino liofilizados) se montaron en la placa de metal-cristal ATR y los espectros se obtuvieron con el software de espectro OMNIC 8 (Thermo Scientific), los cuales fueron posteriormente procesados en el software Origin 8 para la elaboración de los espectros.

3.2.4. Caracterización de los MPs libres de fármaco: F127-Glu y T1307-Glu, determinación de la Concentración Micelar Crítica (CMC)

Las muestras de copolímeros glucosilados, F127-Glu y T1307-Glu, se caracterizaron a través de un equipo de DLS de la UBA (descrito con más detalle en el apartado 3.2.7.), preparadas en dos solventes: PBS y H₂O. Para ello, se prepararon las muestras en 3 mL, 0.15 g de polímero/mL finales de PBS o H₂O. Primero, se hidrataron en heladera (4°C) en 2.5 mL (de PBS o H₂O, según corresponda) por 24 horas, luego se completó a 3 mL finales, y finalmente se realizan y calculan las diluciones según corresponda (0.00125-10 % p/v).

Luego se procedió a la medida por DLS, en ambos medios (H₂O y PBS) para cada muestra. Se equilibraron las muestras a las temperaturas correspondientes de 25°C y 37°C, por 1 y 5 minutos respectivamente, se procedió a la medición de 6 repeticiones y se analiza la derivada de la tasa de cuentas (DTC).

Las mediciones se realizaron a un ángulo de dispersión de 173° en el modo movilidad electroforética. Este contiene un láser He-Ne a 4 mW que opera a una longitud de onda de 633 nm, con un correlador digital ZEN360.

Se representó gráficamente la DTC expresada en kilocuentas por segundo (kcps) (n=4) en función de la concentración de copolímero (% p/v). Los datos para cada MPs individual fueron el resultado de al menos cuatro corridas promediadas.

Se realizaron los ajustes lineales, en base a la tendencia de los puntos, en donde se observaron claramente dos tendencias, se trazaron las rectas, y la intersección de entre ambas corresponden a un valor de concentración, que deriva de la interpolación correspondiente a la CMC de cada una de las MPs diseñadas, dicha metodología se realizó en base a la técnica reportada por Glisoni et. al. (42, 43) con leves modificaciones.

3.2.5. Preparación de las MPs con y sin FNZ

La preparación de micelas poliméricas de poli (óxido de etileno) -b-poli (óxido de propileno) prístina y modificadas con glucosilación (Glu), vacías y cargadas, en disolución acuosa o lipídica (LPS), se llevó a cabo bajo una técnica ampliamente reportada (25, 38).

Para preparar las MPs, se masó 750 mg de F127 prístina, F127-Glu, T1307 prístina, T1307-Glu, T1307:F127 (50:50), en disolución acuosa.

La hidratación del sólido inicialmente fue con 2.5 mL de H₂O. La preparación se deja en frío (4°C) toda la noche. Luego se retiró de heladera y se lleva a 5 mL finales (a temperatura ambiente).

Finalmente, para el preparado de las formulaciones con FNZ, se añadió el mismo a una concentración de 2 mg/mL de disolución acuosa y, en consecuencia, la preparación se agitó durante 24 horas a 200 rpm, en un agitador multipunto.

3.2.6. Preparación de las MPs mezclas con LPS preformadas con y sin FNZ

En el caso de la presente tesis se trabajó con liposomas preformados, con lotes elaborados por gentileza de la empresa argentina MR-Pharma[®], los cuales fueron obtenidos a gran escala, de gran estabilidad y tamaño uniforme.

Los liposomas preformados (LPS) se obtuvieron a partir de 2 mg de colesterol, 6 mg de fosfatidilcolina hidrogenada y 4 mg fosfatidiletanolamina-anclada a PEG, todas de LIPOID[®] dichas relaciones son en 1 mL de disolución.

Para la realización de las mezclas se empleó 3 mL de dicha disolución de LPS preformada, la cual se empleó para la hidratación de 300 mg de los polímeros F127, T1307, T1307-Glu, F127-Glu y sus mezclas respectivas a modo de analizar solubilidades, tamaños y estabilidad.

La hidratación del sólido inicialmente fue con 2.5 mL de LPS. La preparación se dejó en frío (4°C) toda la noche. Luego se retiró de heladera y se lleva a 3 mL finales (a temperatura ambiente con LPS) y finalmente, se añadió una masa de 2 mg/mL de FNZ. La preparación se agitó durante 24 h a 200 rpm, en un agitador multipunto.

Nota: La concentración de fármaco en cada formulación se determinó en espectrofotómetro UV-VIS en mg/mL en una disolución de DMSO utilizando la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración. En base a ello, se

ajustan todas las formulaciones a la misma concentración de fármaco de 2mg/mL. Así mismo aclarar que se utilizaron las terminologías 15% p/v (que denota 15%p/v) y 10 X (que denota 10%p/v).

3.2.7. Caracterización de tamaño de partícula (Dh), potencial Zeta (Z-pot) e índice de polidispersión (PDI) de MPs y MPs mezclas con LPS por DLS

Las mediciones de DLS se realizaron a 25 y a 37°C mediante dispersión de luz dinámica (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Reino Unido) dicho equipo está equipado con un Láser He-Ne (633 nm) y un correlador digital, modelo ZEN3600. Las mediciones fueron realizadas en un ángulo de dispersión del 173° y una luz láser fija de 4.65 mm.

En dicha técnica la muestra se iluminó con un láser, y la intensidad de la luz dispersada producida por las partículas, fluctuó a una velocidad que es dependiente del tamaño de las partículas. El análisis de la intensidad de estas fluctuaciones generó el coeficiente de difusión de la partícula y a partir de éste se determinó el tamaño hidrodinámico de la partícula.

Es importante mencionar que la técnica de DLS empleada, se usa para mediciones de partículas suspendidas en un líquido, y permite medir la difusión de la partícula debido al movimiento Browniano y lo relaciona con el tamaño de la misma. El parámetro calculado se define como el coeficiente de difusión translacional (D).

El tamaño de la partícula se calcula a partir de dicho coeficiente mediante la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Donde, d(H) es el diámetro hidrodinámico; D es el coeficiente de difusión translacional, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad.

Además, mediante la resolución de Mie de las ecuaciones de Maxwell, se puede transformar la distribución por intensidad en distribución por volumen y número. Aunque estas últimas no pueden usarse para informar sobre el tamaño de partícula ya que son estimadas a partir de la primera.

El tamaño se obtuvo a partir de la función de correlación a partir de varios algoritmos. Se consideraron dos aproximaciones:

(i) El análisis de cumulantes donde se ajusta una exponencial simple a la función de correlación para obtener el tamaño promedio (diámetro Z-Average) y una estimación del ancho de la distribución (índice de polidispersión, PDI). PDI es una medida aproximada del grado de agregación.

(ii) Análisis de CONTIN donde se ajusta una exponencial múltiple a la función de correlación para obtener la distribución de tamaños de partículas. El análisis de CONTIN provee información numérica y gráficos de distribución de tamaño.

Así, el valor de Z-Average se empleó para informar un valor promedio, pero es inadecuado para dar una descripción completa de la distribución de tamaños por lo que en la presente tesis se informarán también los picos obtenidos y su porcentaje en intensidad.

Se realizaron seis experimentos de cada MPs vacíos, y los correlativos cargados con FNZ (formulaciones T1307/FNZ, F127 LPS/FNZ, F127:T1307 /FNZ, F127-Glu/FNZ y T1307-Glu/FNZ, entre otros). Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (\pm DE) en el programa del Nano-ZS. Dicho procesamiento se realizó para los valores de D_h , Z-pot y PDI para los MPs vacíos y cargados con FNZ.

3.2.8. Análisis morfológico de MPs

3.2.8.1. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

La microscopia electrónica de transmisión se empleó para estudiar materiales con la preparación adecuada y tengan dimensiones dentro del rango nanométrico o sub-micrométrico. Por sus características, fue utilizado como una herramienta importante para la caracterización estructural de materiales nanoestructurados, de los cuales se puede obtener no solo información morfológica.

Por lo que a partir del ensayo anterior se seleccionaron las MPs con FNZ más promisorias con el siguiente nombre: F127 LPS/FNZ, T1307/FNZ, F127:T1307/FNZ, F127-Glu/FNZ y T1307-Glu/FNZ, y se continuaron con los siguientes estudios.

Se realizó la preparación de 3 mL de MPs, tal como se detalló en el apartado (ver apartado **métodos 3.2.5. y 3.2.6.**) y se colocó 40 μ L de MPs vacías como cargadas con FNZ en una placa de Elisa de fondo plano. Se dejó adsorbiendo una hora a 37 °C con la gradilla correspondiente y posteriormente se hizo el agregado de PTA 2 %, se adsorbe el excedente y se dejó secar a temperatura ambiente por 8 minutos. Luego se procedió a hacer la toma de imágenes y se procesaron con el software Image J y Gimp 8.0.

3.2.8.2. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El análisis por AFM se realizó de las nanoformulaciones más promisorias, sin y con el profármaco FNZ, a modo de complementar la caracterización de tamaño con TEM y DLS.

Se realizó utilizando como soporte mica, depositando 5 μ L de muestra. Se dejó adsorber por 24 horas en oscuridad y en un ambiente libre de polvo. Posteriormente se coloca la muestra en el equipo y se analiza en modo AC/Air, iniciando en una escala de 5 μ m y posteriormente, a escalas más pequeñas.

Se midieron 512 líneas y puntos con una velocidad de barrido de 1 Hz. Se utilizó una punta de silicio de 48 N/m y una frecuencia de resonancia de 190kHz. Se utiliza el software de análisis de las muestras: Igor Pro versión 15.09.112. Se utiliza el software para el tratamiento posterior de las imágenes: Qwyddion 2.52.

3.2.9. Estudios *in vitro* de las nanoformulaciones desarrolladas: Ensayo de liberación de FNZ desde las MPs

Para los estudios de liberación, un volumen adecuado de los nanosistemas con FNZ (5 mL), se colocaron en membrana de diálisis de 3500 Da de cut off a 25 °C en vasos de bohemia, con 40 mL de H₂O, se dejarán en agitación constante y a las 24 horas se llevaron a 200 mL total. Se cuantificará (por espectrofotometría UV-VIS) la liberación de FNZ a 10, 20, 30, 45, 90 y 120 y 1440 minutos. Las tomas de muestra se realizaron fuera de la membrana. Para esto, se toman entre 50-150 µL de muestra liberada, los cuales se repusieron con medio fresco (H₂O).

Así mismo, se agregaron (a la muestra retirada) los µL necesarios de DMSO para su dilución a 1mL. Se analizaron por espectrofotometría UV-VIS a 296 nm. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados se expresaron como % de FNZ liberada acumulada en función del tiempo (**131-136**).

3.2.10. Estudios preclínicos de toxicidad

3.2.10.1. Determinación de toxicidad *in vitro* (Test de AMES)

El procedimiento general implicó realizar un primer ensayo de toxicidad con controles positivos (sin activación metabólica) y negativos donde se obtuvo la dosis estimada de toxicidad en un volumen determinado (50 µL). Luego de dicha estimación, a partir de un promedio de tres ensayos al menos, se

realizaron los cálculos para obtener esa concentración para proceder al test de AMES (en el cual se realiza con una concentración al doble de cada cepa). Finalmente, con esa dosis se realizaron 5 diluciones de la muestra a ensayar (el tercio de la concentración de la dosis inmediatamente anterior), y se procedió a su dilución en DMSO.

Los resultados fueron positivos, y se reportó que el compuesto es mutagénico, siempre y cuando el número promedio de colonias revertientes fuera al menos el doble del detectado en el control negativo (ver **Figura 11**) (**130**). El ensayo se realizó al menos dos veces, en las mismas condiciones, para validarlo en cada cepa y condiciones en las que dio positivo.

Así mismo, se consideró el resultado negativo siempre y cuando también no haya un incremento de colonias relacionado con la concentración.

Esto permitió conocer de antemano, durante el desarrollo de nanofármacos, efectos mutagénicos que éstos pueden causar (**137,138**).

Para ello se utilizaron las cepas de *Salmonella* TA 98, TA100, TA102, TA1535 y TA1537 en medio mínimo de glucosa con agar y disolución de glucosa al 40%.

Se plantearon controles positivos en medios sin S9: 4-nitro-*o*-fenilendiamina (0.2 g/placa para la cepa TA98 y 2.0 ug / placa para las cepas TA100 y TA1537) y azida de sodio (2.0 ug/placa para las cepas TA1535 y TA102).

Mientras que para las pruebas con S9 (activación metabólica) se utilizó: 2-aminofluoreno (10.0 ug/placa para las cepas TA98, TA100 y TA102) y 2-aminoantraceno (2.0 ug/placa para las cepas TA1535 y TA1537) (no reportado en la presente tesis, por resultados a completar).

Se ensayó la mutagenicidad directa de FNZ, T1307 (15% p/v), F127 LPS (10X), T1307:F127 (15% p/v), F127-Glu(15% p/v) y T1307-Glu (15% p/v) (candidatos a carriers de FNZ) en dichas bacterias, a MDT, y cuatro diluciones consecutivas al tercio (dato a base de test de toxicidad realizado en tesis de grado de Carina Sánchez), por triplicado.

Preparación de los tubos de ensayo (con y sin activación metabólica) a sembrar en placa

Por cada tubo:

-500 μ L de PBS 1x o disolución de S9 (ver anexos forma de preparación)

-100 μ L de bacteria (TA 998, TA100, TA1535, TA1537 o TA102)

-50 μ L nanoformulación (FNZ, T1307(15% p/v)/FNZ, F127LPS(10X)/FNZ, T1307:F127(15% p/v)/FNZ, F127-Glu(15% p/v)/FNZ y T1307-Glu (15% p/v)/FNZ) o control negativo (DMSO o H₂O según corresponda, fármaco o nanoformulación, respectivamente) o control positivo (a las concentraciones indicadas según corresponda para cada CEPA).

-2000 μ L de medio completo 1.

Procedimiento general para la obtención de los tubos para su siembra en placa (ver en anexos preparación de todas las disoluciones y medios):

- Se retiró una colonia de la placa master con ansa y se colocó en el medio de cultivo (30 mL de medio líquido oxid N°2), durante 12 horas en estufa a 37°C.
- Se prepararon los tubos según corresponda (sin agar blando) y se incubó en la estufa a 37°C por 1 h.
- Se fundió el agar blando en MW y agregó disolución de Histidina/Biotina (10 mL cada 100 mL de agar blando), medio completo 1.
- Luego de la hora de incubación de los tubos, a cada tubo se le agregó 2 mL de medio completo 1, se agitó vigorosamente y se vertió sobre cada una de las placas de Petri.
- Se procedió al método de AMES propiamente dicho. Para ello se realizó el método de incorporación en placa en el cual luego de aproximadamente 30 minutos (para que se adsorba en todas las placas), y se dejó incubar en la estufa a 37°C durante 48 horas.
- Posteriormente se contó a mano el número de colonias revertantes en cada placa (tres placas por concentración).

Nota: todos los materiales fueron previamente autoclavados a 121°C por 20 minutos o filtrados por filtros de 0.22 µm esteriles

Las placas sin activación metabólica (S9) de los controles positivos y negativo (H₂O) de las nanoformulaciones se realizaron en paralelo.

Recordar que los resultados de la prueba se consideraron “positivos” (mutagénicos) si el número de revertantes es al menos el doble del número de revertantes del grupo de control negativo, en dos concentraciones consecutivas del ensayo y se observó un aumento relacionado con la concentración en el número de revertantes.

Se calculó un promedio con su \pm DE y se realiza el gráfico correspondiente de número de colonias en función de la concentración. De dicho grafico, resulta la pendiente que nos brindara el poder mutagénico en cada cepa ensayada.

Dicho poder mutagénico de cada tratamiento, se definió como la pendiente obtenida de la regresión de la porción lineal inicial de las curvas dosis–respuesta. Dicho grafico se realiza a partir de las 5 concentraciones ensayadas para cada uno de los diferentes tratamientos con MPs y mezclas de MPs con y sin activación metabólica (**137-139**).

3.2.10.2. Estudios de toxicidad en animales BALB/c normales

Todos los protocolos para la experimentación con animales se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos autorizados por la Comisión de Ética de la Universidad (Facultad de Ciencias, UdelaR) para la Experimentación Animal en Uruguay, a quien este proyecto fue previamente presentado y ha sido aprobado con número de protocolo CHEA-UdelaR 240011-002249-15.

Los animales BALB/c hembras fueron recibidos en el Laboratorio de experimentación Animal (LEA) del Centro de investigaciones Nucleares luego de su producción en el bioterio de Facultad de Medicina (URBE). Dichos animales fueron alojados al azar en rack ventilados individualmente, en jaulas autoclavadas, en filas, con 4 animales por jaula, a una temperatura ambiente

de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 40-50 % de humedad (ver **Figura 13**). El recinto cuenta con ciclos luz/oscuridad artificial, de 12 horas, respectivamente.

Los animales fueron alimentados *ad libitum* a la dieta estándar de pellets y el H₂O autoclavados (**108**). Se procedió a trabajar con ellos después de un mínimo de 3 días de aclimatación a las nuevas condiciones de alojamiento en el LEA. En ese momento, se procedió a hacer la inoculación de células, tal como fue descrito en el apartado *modelo BALB/c normal y con tumor inducido para análisis de potenciales formulaciones farmacéuticas*.

Los animales al momento de los ensayos, contaban con menos de 8 semanas de edad y presentan un peso promedio de 18 g al comienzo de los ensayos, libre de patógenos (**100, 102**).

Al final de los experimentos propuestos los animales fueron anestesiados con isofluorano y sacrificados posteriormente por dislocación cervical (**100**).



Figura 13. Fotografía del rack del LEA, donde se señala la fila donde fueron alojados los ratones BALB/c al azar. En azul se marca la fila empleada para los ratones de todos los ensayos propuestos.

Las vías de administración más empleadas en ratones de las MPs y mezclas de MPs con LPS por su composición y biocompatibilidad son: parenteral (IV, IM, IP, SC), oral, intranasal y ocular, entre otras de interés (37-40). Particularmente se debe tener en cuenta, el tipo de forma farmacéutica desarrollada, la cual impactará directamente sobre la vía de administración a seleccionar. Las características a tener en cuenta son: el volumen a inyectar, la solubilidad del compuesto, la posología (diaria o no) y el sitio blanco de la sustancia que transporta el nanovehículo. Por lo que en la presente tesis se emplearon las vías de inoculación IP/IV según correspondió.

3.2.10.2.1. Estudios de toxicidad aguda en animales BALB/c normales: Test de -Up and Down-

Se realizó el método de "up-and-down" el cual es un método que está estandarizado en los protocolos de la OECD. La estimación de la DL_{50} fue realizada por el software estadístico AOT AOT425 Stat Pgm (101) a partir de las distintas dosis suministradas y las respuestas obtenidas valoradas por el Test de Irwin, que permitió la valoración del estado fisiológico y comportamental del ratón (140-144).

Particularmente se empleó el "test limite" en el cual se usan como máximo 5 animales secuencialmente con una dosificación de 2000 mg/kg.

Se utilizaron ratones hembras, adecuado por el propio modelo de estudio de cáncer de mama, asimismo porque la bibliografía demuestra que para las pruebas de LD_{50} convencionales, las hembras son generalmente un poco más sensibles, en algunos casos (igualmente se reporta muy poca diferencia en la sensibilidad entre los sexos).

Si ante una primera dosificación el animal murió, se realiza la prueba principal para determinar la LD_{50} . Si el animal sobrevivió, se dosifica cuatro animales adicionales de manera secuencial para que un total de cinco animales sean

ensayados por tratamiento. Sin embargo, si tres animales mueren, se termina el limit test y se comienza con el test conocido como el “main test”.

El LD₅₀ es mayor que 2000 mg/kg si sobreviven tres o más animales, tal como en la presente tesis. Igualmente es importante aclarar que, si un animal muere inesperadamente al final del ensayo, y hay otros sobrevivientes, es apropiado interrumpir la dosificación y observar a todos los animales para ver las condiciones generales de estos a fin de predecir si también morirán durante un período de observación. Las muertes tardías se deben contar igual que otras muertes.

Para ensayos que se realizan por primera vez, resulta sumamente necesario el empleo de un test adicional como lo es el “test de Irwin”. Los resultados se evaluaron de la siguiente manera (O= supervivencia, X= muerte) lo cual es evaluado en el programa estadístico que ya se ha mencionado (ver **Tabla 25 en anexos**) (141,142,144).

Particularmente para los ensayos de la presente tesis, se empleó el “test limite” en el cual se usó 5 animales secuencialmente con una dosificación única de 2000 mg/kg por masa de animal analizados cada uno por 72 horas (a 0.5, 1.5, 3, 5, 12, 24, 48 hasta 72 horas) controlando todas las funciones vitales del animal (ver en **anexos, test de Irwin**).

Posteriormente, se anestesiaron los animales con isofluorano y se sacrificaron por dislocación cervical. Se realizó necropsia de los animales a modo de ver cambios fisiológicos macroscópicos (adherencias y/o cambios macroscópicos de los órganos), los cuales fueron reportados en tablas según lo observado e identificado para su posterior análisis.

La posología fue IP de 0.185 µL de MPs y mezclas de MPs con FNZ y se comparan con FNZ en DMSO al 4 %, así determinaremos las concentraciones del fármaco para los futuros tratamientos (que estarán por debajo de la MDT) con las MPs y mezclas de MPs con FNZ mas promisorias.

3.2.10.2.2. Test de Irwin aplicado a los animales tratados con las nanoformulaciones desarrolladas

Los animales bajo tratamiento fueron observados sistémicamente para cuantificar algunos parámetros clínicos normales que podrían verse afectados en los animales. En este sentido se valoró el estado fisiológico y comportamental de los modelos animales.

En dicho test se realiza una observación individual de cada animal luego de su dosificación IP de 2000 mg/kg a las: 0.5, 1.5, 3, 5, 12, 24, 48 y 72 horas, hasta el día 14 post-inyección.

Las observaciones de cada modelo experimental (especimen) se registraron en una planilla, y entre los parámetros a evaluar tenemos cambios en: aspecto de piel y pelaje, ojos y membranas mucosas, respiratorios, circulatorios, autonomía del sistema nervioso central y actividad somatomotora, patrón comportamental, presencia de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma, entre otros (ver **Tabla 25** en **anexos, test de Irwin**).

Asímismo, se realizó un registro del peso individual de cada animal en el régimen mencionado (0.5, 1.5, 3, 5, 12, 24, 48 y 72 horas, luego diariamente hasta el día 14 post-inyección).

En el día 14 post dosificación, los animales supervivientes se pesaron y se sacrificaron teniendo en cuenta los métodos de punto final humanitario, ya mencionado.

Luego cada animal se sometió a una necropsia general y se registró todos los cambios generales patológicos para cada animal (**98,141, 142, 144**).

3.2.11. Desarrollo de un modelo tumoral *in vivo*

3.2.11.1. Cultivo de células murinas de cáncer de mama 4T1

En la presente tesis se empleó la línea celular de ATCC 4T1 (CRL-2539™, ATCC®), y el proceso de cultivo se detalla a continuación.

Se descongeló rápidamente una ampolla en un baño de H₂O a 37 °C, cuando los cristales de hielo desaparecen, se trató la superficie exterior de la ampolla con etanol 70 %.

Luego ya en la cámara de flujo laminar, se colocó el contenido del criotubo en un falcón estéril de 10 mL el cual ya contenía 9 mL de medio de cultivo completo (a una temperatura de 37 °C aproximadamente). Se centrifugó, se quitó el medio y se resuspendieron las células con el agregado de medio completo nuevo.

Posteriormente se colocaron las células en placas T25 y se dejó que las células se recuperaran, durante la noche, en estufa a 37 °C en atmosfera de 5 % CO₂.

Al día siguiente, se observaron las células, y en algún caso ya estaban adheridas, por lo que fue necesario el aspirado del medio de cultivo de la capa de células y se reemplazó con medio fresco, se volvieron a colocar en estufa a 37 °C.

Finalmente, se propagaron las células hasta que alcanzó el 70-80 % de confluencia, y se procedió al subcultivo en una placa T75 (tantas como las necesarias para el ensayo *in vivo* diseñado), las cuales fueron calculadas (en cantidad) en base a la cantidad de ratones BALB/c para los ensayos *in vivo* planificados. Luego de llegar a confluencia, las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en RPMI, teniendo en cuenta una inoculación de 700000 células en 100 µL de dicho medio (cantidad de células inyectadas por ratón) (130).

3.2.11.2. Obtención de modelos de tumores de mama 4T1 en ratones BALB/c.

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones hembra BALB/c (ya descritos en la introducción) de 18.0 g promedio de masa corporal. Así mismo el modelo de tumor 4T1 (ya descrito) se inoculó (700000 células/100µL) por vía subcutánea en la cuarta glándula mamaria (en la zona de tejido mamario de los ratones, tomando como referencia el pezón de la región pre inguinal izquierda) de a 16 ratones por vez.

Los animales se palparon, con el índice y el pulgar diariamente, para registrar la presencia, la ubicación y el volumen de todos los tumores.

Cuando los tumores comenzaron a desarrollarse, se ubican de tres o cuatro ratones en una jaula, según el ensayo.

Los diámetros del tumor se midieron diariamente con un calibre estéril vernier (ostrand-rosenberg). Los dos diámetros del tumor, largo (L) y corto (C), fueron perpendiculares entre sí y abarcaron la porción más grande del tumor en cada dirección. El volumen del tumor (V) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$V = (C^2 \times L)/2 \text{ (145-147).}$$

3.2.11.3. Estudios *in vivo* de evaluación de la actividad antitumoral de los nanosistemas libres y con FNZ encapsulada

Luego de caracterizar las nanormulaciones se procedió a los estudios de actividad antitumoral, con el fin de evaluar su actividad en un modelo de tumor de mama simil fase 4 humano (4T1) en ratones BALB/c (105,142).

La posología del fármaco puede ser diversa, siendo una de las más reportadas, una única dosis por día. Por lo que se comenzó en la presente tesis con una posología única diaria por 5 días con descansos (6).

Nota: se observó efectos secundarios adversos como piloerrecion y taquicardias en los animales BALB/c sin tumor inyectados IP con T1307 encapsulando FNZ 20 mg/kg (como ensayo piloto).

Por lo que se cambió a una dosificación igual pero intercalada, con descanso día por medio, y después de la tercera dosis dos días de descanso.

Hay que considerar (tal como se indicó anteriormente) que la elección debe basarse en cuanto a las características generales del fármaco, vehículo a testear, modelo tumoral empleado y su sobrevida. Siendo así que en este caso se ha elegido 16 días en los distintos tratamientos y la selección de la vía IP como vía administración (ver **Tabla 4** y **Figura 14**) de acuerdo a la posología (volúmenes, disponibilidad y tipo de formulación) (**146-154**).

Cabe destacar que dichos tratamientos comenzaron el día 5 después de la inoculación de las células (ya que los animales presentan tumores palpables, medibles con calibre).

Se midió el tumor en el modelo y se calculó el volumen tumoral con el calibre antes de cada día del tratamiento. Se tuvo en cuenta la reducción del tamaño tumoral (ver cálculo del volumen tumoral en el apartado anterior) al final del estudio para la valoración de la eficacia como antitumorales.

Se definieron los siguientes grupos "tratamiento":

- i) Vehículos con FNZ (T1307, F127 LPS, T1307:F127, F127-Glu y T1307-Glu), administrado a 14.8 mg/kg de peso corporal por vía IP (n=6, por tratamiento)
- ii) control negativo (vehículos y H₂O) (n=6)

En el día 16 post inoculación del tumor, cada animal es sometido a necropsia macroscópica. Todos los cambios patológicos se registran para cada animal.

Se evaluó el porcentaje de inhibición del tamaño tumoral (%ITT) con cada tratamiento de MPs y mezclas de MPs con FNZ a las concentraciones propuestas. Así mismo se realizó la masada de los tumores y a su vez análisis clínicos (bioquímicos y hematológicos) de los animales al finalizar los tratamientos.

	Rutas y volúmenes de administración (mL/kg)		
	IP	IV Bolus	IV Perf.
Ratón	20	5	25

Tabla 4. Resumen de los volúmenes de administración reportados empleados para ratones en general. * *IP* es *inoculación intraperitoneal* e *IV* es *intravenosa*.



Figura 14. Imagen representando la vía elegida de inyección en ratones BALB/c normales y con tumor de mama inducido, simil fase 4 humano (155).

3.2.11.4. Análisis clínicos post-tratamiento

En el día 18, antes de que cada animal fue sometido a necropsia macroscópica, se le extrajo sangre a cada uno, y se realizó un único pool de sangre de los animales tratados con cada formulación, para realizar los estudios bioquímicos y hematológicos, con el fin de comparar con respecto a

los valores normales en el modelo BALB/c en el LEA del CIN (ver la siguiente **Tabla 5**).

Nota: Los parametros normales son los reportados por Jackson Laboratory, quien provee las cepas a URBE.

Por ello se extrajo seccionando la arteria subclavia procurando que el animal tenga el menor sufrimiento posible, considerando las buenas prácticas de manipulación de animales.

Nota: Las determinaciones bioquímicas y hematológicas se realizaron inmediatamente después de la extracción (**156**), manteniendo la sangre en tubos con EDTA o heparina a 0°C, se centrifugan las muestras y se procedió a las mediciones, las cuales estuvieron a cargo de la Q.F. Cristina Pintos (Cátedra de Análisis Clínicos, Facultad de Química), quien los informó en una tabla con los valores obtenidos de los parámetros antedichos.

Valores bioquímicos normales típicos del ratón*		
Parámetro	Valor medio reportado	Unidad
Glicemia	0.83-2.81	(g/L)
Urea	0.07-0.34	(g/L)
Creatinina	0.2-0.5	(mg/dL)
GPT(ALT)	40-170	(UI/L)
GOT (AST)	67-381	(UI/L)

Valores hematológicos normales de ratón BALB/c*		
Parámetro	Valor medio reportado	Unidad
Hematocrito	42.1-67	%
Concentración de hemoglobina	10.9-18.9	g/dL
MCV(volumen corpuscular medio)	48.0-64.1	fL

MCH (Hemoglobina corpuscular media)	13-17.6	Pg
MCHC (Concentración de hemoglobina corpuscular media)	23.9-33.1	g/dL
Plaquetas	476-1611	10 ³ cel / μ L
Leucocitos	5.69-14.84	10 ³ cel / μ L
Neutrófilos	0.74-3.01	10 ³ cel / μ L
Eosinófilos	0.00-4.0	10 ³ cel / μ L
Basófilos	0.00-0.16	10 ³ cel / μ L
Linfocitos	3.6-11.56	10 ³ cel / μ L
Monocitos	0.34-1.37	10 ³ cel / μ L

Tabla 5. Valores normales de análisis clínicos y hematológicos de ratones hembras sanas de 8 semanas de edad (Jackson Laboratory y Chales River, n=158) (**154, 155**). *Nota: los datos son los descritos para BALB/c hembras de 8 semanas, en similares condiciones de alojamiento.

3.2.12. Estrategias de marcación para seguimiento *in vivo*

3.2.12.1. Encapsulación y estudios de biodistribución de MPs a base de T1307 y T1307-Glu cargadas con ^{99m}Tc(CO)₃-FNZ

El [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ se obtuvo mediante la mezcla 20-22 mCi de ^{99m}TcO₄⁻ y el kit tricarbonilo se dejó en agitación durante 30 minutos, a 100°C y se ajustó el pH a 6.5, para obtener una óptima condición fisicoquímica de marcado.

La preparación de ^{99m}Tc(CO)₃-FNZ se realizó mediante la adición de 1.24 μ mol de FNZ a 0.5 mL de [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ y se colocó en incubación 30 minutos a 70 ° C.

El producto de esta reacción se analizó por HPLC e ITLC usando un MeOH: HCl (99.5: 0.5) como fase móvil.

Cabe destacar que las MPs se preformaron con anterioridad (24 horas antes de cada ensayo). Se masó 0.3 g de T1307 y T1307-Glu y se colocó a hidratar con 1 mL de H₂O a 4°C por 24 horas, posteriormente se termostató a 25°C, para el posterior agregado de 0.930 µL de ^{99m}Tc(CO)₃-FNZ (luego de su posterior control por HPLC e ITLC) y H₂O hasta completar 2 mL.

Se dejó en agitación (1 hora) y se procedió a la inyección IV (pH=6.9) en ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1.

Finalmente se agitó y se colocó a 37°C para su posterior control por HPLC e ITLC con MeOH: HCl (6 N) (99.5: 0.5) como fase móvil.

Se procedió a la inoculación IV de 1 mCi (150 µL) de ^{99m}Tc(CO)₃-FNZ (**104**), ^{99m}Tc(CO)₃-FNZ/T1307 y ^{99m}Tc(CO)₃-FNZ/T1307-Glu en ratones BALB/c con tumor de mama 4T1 (n=4, por grupo) a los 14 días post inoculación de las células tumorales.

Se procedió a anestesiarse al animal con isofluorano para tomar imágenes en la plataforma *in vivo* en el equipo FX PRO de la Facultad de Ciencias-UdelaR (In-Vivo MS FX PRO instrument, Bruker, 268 Billerica, USA) donde se midieron utilizando los modos de rayos X y gamma. Luego se sacrifican los animales por dislocación cervical. Se extraen los órganos (vaso, corazón, pulmones, riñones, intestino, hígado, sangre, músculo, hueso y tumor) y se mide la %Act/g de cada órgano a 1 y 2 horas post inoculación IV de las formulaciones antedichas que se muestren como promisorios agentes de imagen.

3.2.12.2. Marcación directa de MPs de T1307 a través ^{99m}TcO₄⁻

Con el fin de marcar el T1307 directamente por reducción de ^{99m}TcO₄⁻ con estaño, se agregaron 0.2 mL de SnF₂·2H₂O (stock de 1 mg/mL de EtOH) a 0.5 mL de T1307 (0.15 g/mL) y 14 mCi de ^{99m}TcO₄⁻. El pH fue ajustado a 6.5-7.0 con hidróxido de sodio 0.1 M. La mezcla se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos con amicon de 10 KDa (Microcon® centrifugal filter (cut off 10 kDa) con membrana

de baja unión Ultracel[®], EEUU). En el sobrenadante acuoso se determinó la pureza radioquímica en porcentaje (%PR), para el posterior uso en animales BALB/c con tumor de mama inducido 4T1.

La pureza radioquímica se estimó por: i) cromatografía instantánea en capa fina ascendente (ITLC) en tiras de gel de sílice (Pall Corporation, Port Washington, NY) en los sistemas: a) disolución salina; b) piridina: ácido acético: agua (3: 5: 1.5 v / v); ii) RP-HPLC (Agilent 1200 Series Infinity Star, Santa Clara-EE. UU.) con una columna Kinetex C-18 de 5 μm de poro (Phenomenex) utilizando como fase móvil una disolución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.05 % (solvente A) y acetato de etilo / ácido trifluoroacético 0.1 % (solvente B). La velocidad de flujo fue de 1 mL/minuto y realizado en gradiente, 20 minutos en total, el cual fue analizado mediante detecciones UV a una longitud de onda de 340nm y gamma.

3.2.12.3. Biodistribución de ^{99m}Tc-T1307 MPs

El estudio de biodistribución de ^{99m}Tc-T1307 se realizó mediante inyección IV, a través de cola, de 856 μCi de ^{99m}Tc-T1307 en ratones BALB/ c con tumor 4T1 inducido (al día 14 post inoculación).

Los animales inyectados (n=3, por formulación) para cada punto post inyección a tiempo 1, 2, 4 y 24 horas después de las inyecciones IV, fueron sacrificados por dislocación cervical después de dichas inyecciones IV.

La radioactividad en órganos y tejidos se midió en el equipo ORTEC, contador de centelleo sólido con detector de cristal NaI (TI) “3x3” asociado con un analizador de canal único analizador monocanal (ORTEC).

Los resultados fueron expresados como el porcentaje de absorción de la dosis inyectada de peso del tejido (%Act/g).

3.2.13. Estudios estadísticos

El análisis estadístico se realizó a través de programa origin 8.0 y Excel 2010 (prueba t de Student (en una comparación entre dos grupos)), graphpad 6.0 (con el test ANOVA "one way/two way" con corrección de Bonferroni post hoc test (Bonferroni's multiple comparison test)). Las diferencias entre los parámetros evaluados fueron estadísticamente significativas si el p valor es menor a 0.05 y muy significativo a p valor menor a 0.0001

4. Resultados

4.1. Síntesis de FNZ y determinación de solubilidad intrínseca para posteriores ensayos de solubilidad en MPs

La FNZ sintetizada se obtuvo con un rendimiento del 56 % (ver **Figura 15**), a partir de una técnica reportada por Lavaggi *et al.* con leves modificaciones para su escalado (**123**).

El fármaco presentó una solubilidad en H₂O de 208 µg/mL a 25°C, lo que luego permitió calcular las solubilidades de FNZ en las diferentes MPs Y MPs mezclas con LPS a 25°C (ver **Tabla 6**), a partir de la interpolación en la curva realizada (ver en **anexos**).

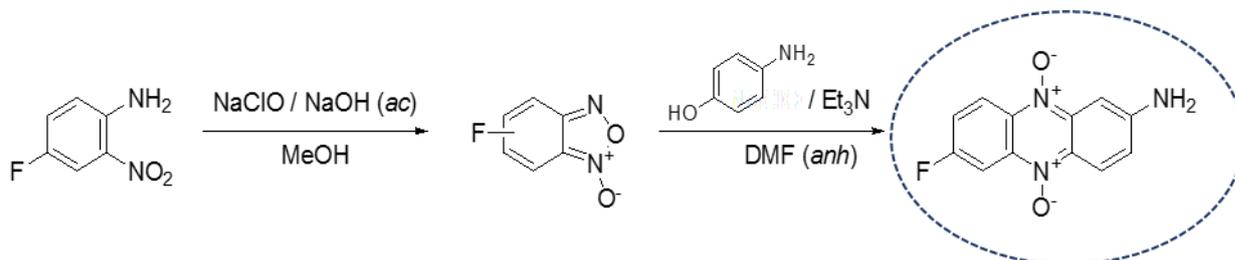


Figura 15. Esquema de los pasos de obtención de FNZ.

Sistema	fs ^a (±DE)	Solubilidad (µg/mL) (±DE)	%EE ^b
FNZ libre	-	208(23)	-
F127 (15% w/v) LPS/FNZ	8.3(1.6)	1733(72)	83.3
F127-Glu(15% w/v)/FNZ	9.1(2.1)	1890 (25)	91
T1307(15% w/v)/FNZ	9.47(1.6)	1970 (31)	94.7
T1307-Glu(15% w/v)/FNZ	7.8(1.8)	1494 (78)	72
F127:T1307 (15% w/v) /FNZ	13.5 (1.2)	2806 (142)	100

Tabla 6. Resultados de MPs en agua/mezclas de MPs con LPS. ^afactor de solubilidad (fs) calculado como $S_{\text{FNZ encaps}}/S_{\text{FNZ libre}}$ calculado por UV-VIS a 25°C. $S_{\text{FNZ encaps}}$ es la concentración de FNZ en todas las MPs y $S_{\text{FNZ libre}}$ es la solubilidad intrínseca de FNZ en agua ultrapura; ^b Eficiencia de encapsulación en porcentaje (% EE) a 25°C.

4.2. Conjugación de F127 y T1307 con gluconolactona (Glu)- Caracterización por RMN y FTIR de los conjugados

Se sintetizó F127-Glu a partir del poloxámero F127 pristino y gluconolactona (Glu) a través de una reacción conocida como conjugación por apertura de anillo lactona (ROP), empleándose F127 pristino como reactivo iniciador (-OH) y Glu como lactona cíclica (**42**). Se caracterizó el derivado F127-Glu por ¹H-RMN, presentando una fuerte señal de triplete -CH₂-OH a 4.58 ppm y señales débiles de -OH (entre 5.12 y 5.86 ppm) que corresponden al resto Glu (ver **Figura 16**) (**42**). Se obtuvieron rendimientos de reacción del 91%, similares a lo ya reportado por Glisoni *et al.* (**42**).

Asimismo, se sintetizó un nuevo derivatizado de la poloxamina T1307 y gluconolactona (T1307-Glu), a partir de la técnica antes mencionada., con leves modificaciones (**42**). Dicha síntesis se logró con un rendimiento del 81 %, y se confirmó la estructura de dichas MPs funcionalizadas con gluconolactona por RMN, tanto ¹H como ¹³C, como se ha descrito por parte de Glisoni *et al.* para los poloxameros F127 (**42**). En este sentido se encontraron señales del grupo -CH₃ a 1.02 ppm que se consideró como referencia integrando 276

hidrógenos tal como se espera para este tipo de poloxaminas de acuerdo a lo descrito por Gonzalez-Lopez *et al.* (39). A partir de esta señal, fue posible identificar el triplete a 2.51 ppm que integra los 4 protones correspondientes al -CH₂-CH₂ del core de etilendiamina, y lo que es más importante, la evidencia de incorporación de los protones provenientes de la gluconolactona. En las Figuras 17 y 18, se observa los espectros de ¹H RMN de T1307 y T1307-Glu superpuestos (T1307 en azul; y T1307-Glu en rojo) y ¹³C RMN (ver Figura 19), donde se observan diferencias en las resonancias que hablan de una eficiente funcionalización de gluconolantona con la poloxamina T1307, apreciándose la presencia de carbonos típicos a grupos ésteres y la incorporación de al menos dos motivos derivados de glucosa por molécula de T1307.

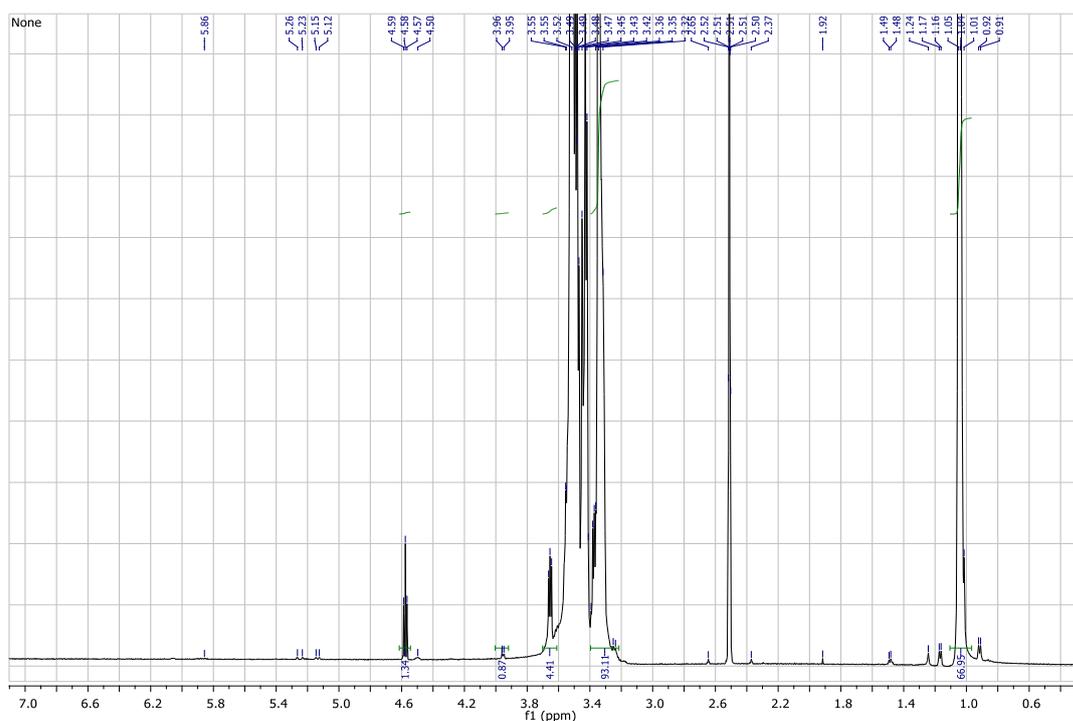


Figura 16. Espectro completo de ¹H-RMN entre 0 y 7 ppm de F127-Glu al 20% p/v de DMSO-d₆, temperatura 22 °C, procesado con software MestReNova.

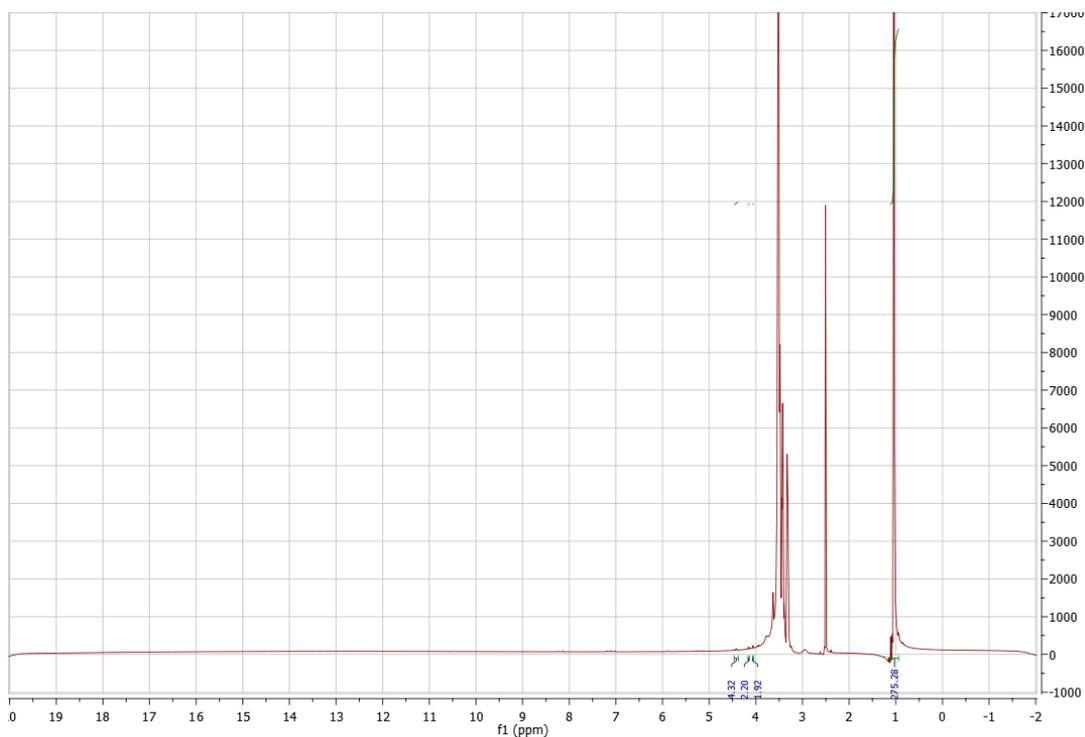


Figura 17. Espectro completo de ^1H -RMN entre 0 y 20 ppm de T1307-Glu al 20% p/v de $\text{DMSO-}d_6$, temperatura 22 °C, procesado con software MestReNova.

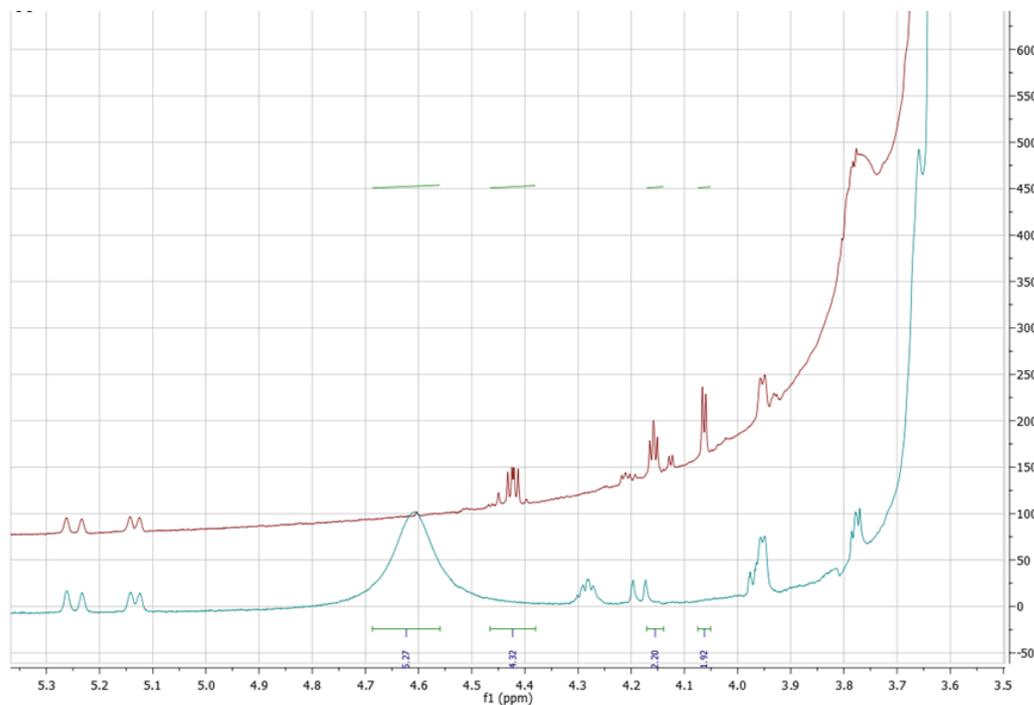


Figura 18. Sección de los espectros de ^1H -RMN de T1307-Glu (rojo) y T1307 (azul) (superpuestos) donde se muestra la región ampliada entre 3.5 y 5.3 ppm procesado con

software MestReNova al 20 % p/v de DMSO- d_6 , temperatura 22°C. Nota: la integración corresponde a los protones del motivo derivado de glucosa en T1307-Glu.

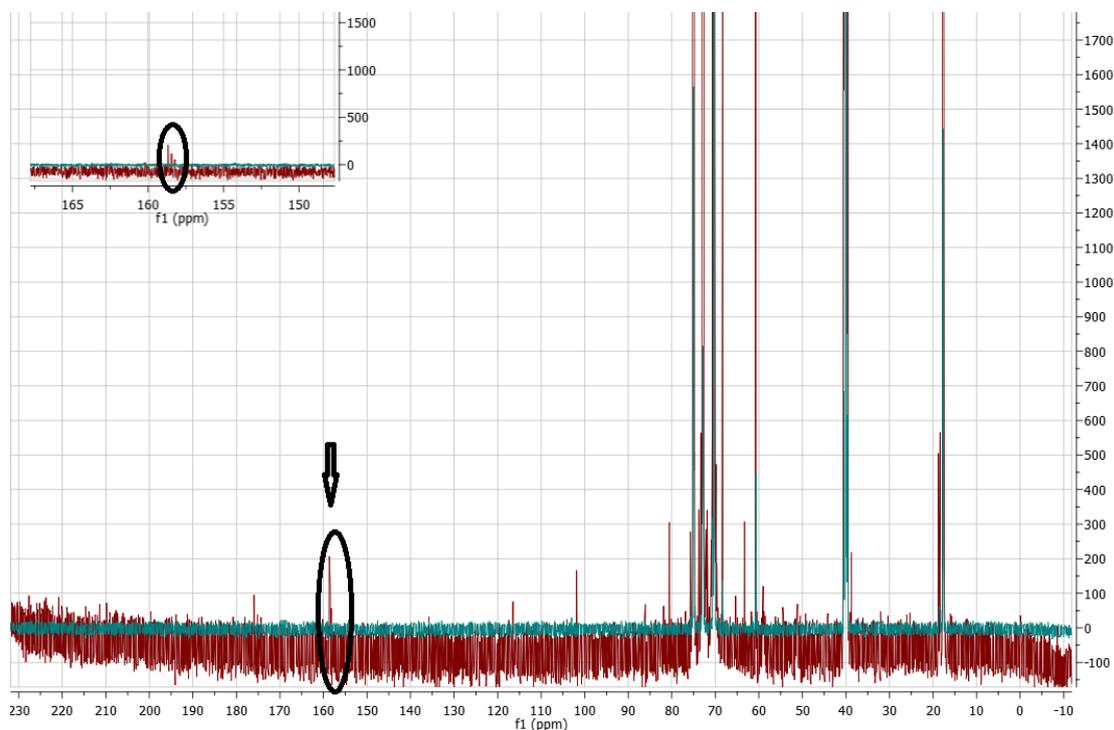


Figura 19. Espectro de ^{13}C -RMN de T1307-Glu al 20 % p/v en DMSO- d_6 , temperatura 22 °C, entre 0 y 230 ppm, procesado con software MestReNova.

Asimismo, la muestra de T1307 se caracterizó por FTIR, dicho copolímero prístino mostró vibración de estiramiento de C-H y C-O-C de bloques de PEO y PPO a 2881 y 1094 cm^{-1} (ver **Figura 20 B**).

En el caso de T1307-Glu, estas bandas se mantienen incambiadas (ver **Figura 20 A**). El derivatizado presenta una banda 1641 cm^{-1} que puede corresponder a la vibración de estiramiento de los grupos carbonilo de la nueva función éster generada (ver **Figura 20 A**), que el prístino no presenta. Ya nuestro grupo ha descrito comportamientos espectroscópicos similares para polímeros igualmente funcionalizados sintéticos con este tipo de residuos de azúcar (**42**).

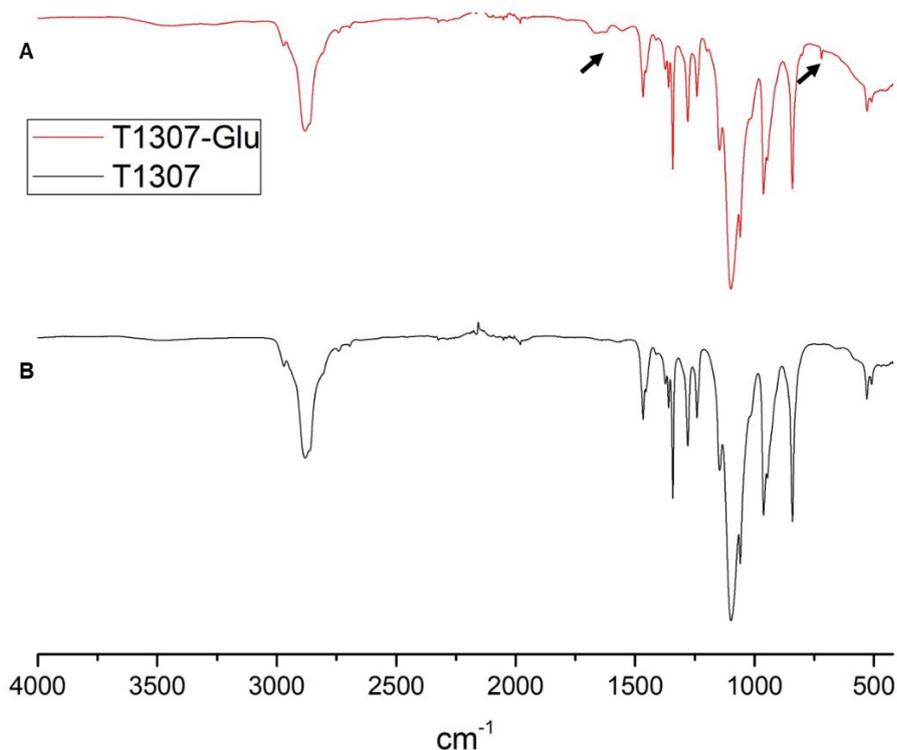


Figura 20. Espectro de FTIR (A) T1307-Glu liofilizado y (B) T1307 pristino liofilizado a temperatura ambiente.

4.3. Valores de CMC obtenidos a partir de DLS de los derivatizados F127-Glu y T1307-Glu en H₂O y PBS

Los valores de CMC de los copolímeros glucosilados se estudiaron para analizar la autoagregación y la estabilidad física de las MP en medio acuoso (agua) y en PBS, a misma concentración de polímero, tanto a 25 como a 37°C (ver **Tabla 7**) a modo de tener mayor información para una eventual aplicación clínica.

En agua, F127 mostró un valor de CMC de 0.25 % p/v a 25°C y una disminución significativa (0.06 % p/v) a 37°C que fue consistente con la capacidad de respuesta térmica inversa de PEO-PPO ya reportado (31). En particular, los valores de CMC en PBS fueron mucho más altos a 25°C y 37°C

(0.562 y 0.270, respectivamente), se puede observar una disminución a la mitad a 37°C si lo comparamos con lo obtenido a 25°C en PBS.

Sin embargo, F127-Glu mostró valores más bajos, 0.02 y 0.01 % p/v a 25 y 37°C, respectivamente en agua; y notablemente menos llegando a 0.01 y 0.005 % p/v a 25°C y 37°C, respectivamente en PBS (ver **Tabla 7**).

Por otro lado, T1307 presentó cambios significativos entre los resultados obtenidos de CMC a 25°C y 37°C en ambos medios (H₂O y PBS), apreciando una disminución del orden de la mitad en los valores de CMC en PBS a 25°C pero aumenta al doble a 37°C.

Sin embargo, T1307-Glu tiene valores más bajos de CMC que T1307. Además, los valores de CMC disminuyen con el aumento de la temperatura tanto en H₂O como en PBS y son más altos en PBS que en H₂O en ambas temperaturas, igualmente presenta diferencias más notorias en H₂O que en PBS a 25°C que a 37°C si comparamos ambos medios (ver **Tabla 7**).

Estas reducciones de los valores de CMC de F127-Glu y T1307-Glu, en comparación con los prístinos, indicarían un incremento de la tendencia a la micelización por medio de la estabilización física. Dicha estabilización, los hacen aptos para uso biológico debido a los autoensamblados generados en condiciones de gran dilución, como los que se someterían después de una administración IP/IV.

Copolímero	Agua		PBS	
	25°C	37°C	25°C	37°C
F127	0.250	0.060	0.562	0.270
F127-Glu	0.02*	0.01*	0.01	0.005
T1307	0.025	0.025	0.1	0.05
T1307-Glu	0.012	0.008	0.025	0.01

Tabla 7. Resultados de CMC de MPs prístinos y glucosilados: F127, F127-Glu en H₂O (pH:6.43) y PBS (pH:6.8), T1307 y T1307-Glu en H₂O (pH:6.4) y PBS (pH:6.92) a 25°C y 37°C, determinados por DLS. *Los resultados concuerdan con los ya publicados (41,160).

4.4. Caracterización de tamaño de partícula (Dh), potencial Zeta (Z-pot) e índice de polidispersión (PDI) de MPs y MPs-mezclas con LPS preformados por DLS

Esta caracterización se llevó a cabo en MPs vacías y las micelas cargadas con FNZ a partir de DLS.

En base a lo anterior se sintetizó y desarrolló nanosistemas/nanosuspensiones capaces de transportar FNZ, particularmente con MPs y mezclas de MPs para mejorar la biodisponibilidad de dicho fármaco.

De este modo, desarrollamos y caracterizamos los siguientes nanosistemas: T1307, F127 LPS, T1307:F127, F127-Glu y T1307-Glu) y MPs prístinos y mezclas de MPs cargados con FNZ (F127 LPS / FNZ, T1307/FNZ, T1307:F127, F127-Glu / FNZ, y T1307-Glu / FNZ). Todos los MPs y mezclas de MPs que se desarrollaron mostraron una solubilidad de FNZ incrementada con una carga alta de FNZ.

Los MPs y mezclas de MPs cargados con FNZ aumentaron la solubilidad de FNZ en H₂O (factor de solubilidad) en 4.7, 10.1, 9, 6.1 y 4.8, respectivamente para F127 LPS / FNZ, T1307/FNZ, T1307:F127, F127-Glu / FNZ, y T1307-Glu / FNZ determinados por UV-VISa 296 nm (ver **Tabla 6**). Logrando en todos los casos una solubilidad de 2 mg/mL.

Así mismo, mostraron un tamaño hidrodinámico entre 30 y 511 nm (ver **Tabla 8**) y revelaron valores de potencial zeta de -1.59 a -27.6 mV (ver **Tabla 8**), lo que lo hace compatible con las membranas biológicas para su posterior endocitosis. En particular, el potencial zeta de las MPs glicosiladas fue mucho mayor que las MPs no glicosiladas. El tamaño promedio de las micelas aumentó después de la encapsulación de FNZ, y en la mayoría de los casos a 37°C.

Además, las mezclas de MPs con LPS (**Tablas 9 y 10**) resultaron valores mayores zeta potenciales, lo que resulta muy promisorio para su uso en medios biológicos. Por lo que se optó en profundizar en los siguientes estudios con mezclas de polímeros prístinos mezclas, prístinos con LPS y glucosilados (TEM, estudios de toxicidad *in vitro* e *in vivo*).

Sistemas	T(°C)	FNZ (mg/mL)	Pico 1 ^a		Pico 2 ^b		PDI(±DE)	z-pot negativos (±DE)
			Dh (nm) (±DE)	% Intensidad (±DE)	Dh (nm) (±DE)	% Intensidad(±DE)		
F127 (15% p/v)	25	0	4.5 (0.1)	49.7 (1.7)	47.4 (3.4)	50.3 (1.7)	0.594 (0.054)	2.90 (0.437)
		2	552(74)	100.0 (0.0)	-	-	0.440 (0.052)	17.3(1.120)
	37	0	6.7 (0.8)	49.8 (4.1)	30.7 (1.6)	50.2 (4.1)	0.395 (0.009)	
		2	16.6 (1.7)	9.3 (1.7)	239 (19.6)	90.7 (1.7)	0.392 (0.034)	
F127-Glu (15% p/v)	25	0	40.5 (4.0)	25.6 (1.6)	410.5 (29.9)	74.4 (1.6)	0.359 (0.023)	1.96(0.170)
		2	700(63.8)	100(0.0)	-	-	0.335 (0.054)	1.59(0.182)
	37	0	21.5 (2.0)	26.4 (18.2)	230.0 (2.0)	73.6 (18.2)	0.304 (0.127)	
		2	462 (61.1)	61.3 (0.8)	21.64 (0.44)	38.7 (0.8)	0.431 (0.058)	
T1307 (15% p/v)	25	0	4.7 (0.1)	41.8 (3.2)	60.8 (5.2)	58.2 (3.2)	0.460 (0.120)	2.85(0.464)
		2	984.0 (55.0)	100.0 (0.0)	-	-	0.557 (0.113)	3.31(0.659)
	37	0	7.4 (0.2)	49.0 (5.3)	33.8 (4.1)	51.0 (5.3)	0.228 (0.085)	
		2	1233 (224.2)	100.0 (0.0)	-	-	0.461 (0.043)	
T1307-Glu (15% p/v)	25	0	57.3 (8.7)	43.0 (3.1)	619.3 (63.9)	57.0 (3.1)	0.614 (0.140)	7.6(0.710)
		2	511(54.4)	100.0 (0.0)	-	-	0.213 (0.077)	1.93(0.481)
	37	0	27.0 (5.9)	57.1 (8.2)	292.5 (150.4)	42.9 (8.2)	0.677 (0.107)	
		2	433 (61.5)	100.0 (0.0)	-	-	0.251 (0.083)	
T1307:F127 (50:50) (15% p/v)	25	0	4.5 (0.3)	23.3 (1.1)	88.7 (2.5)	76.7 (1.1)	0.667 (0.018)	13.9(0.554)
		2	59.7(2.11)	72.0(2.088)	5.4(0.17)	28(2.43)	0.180 (0.077)	2.78(0.286)
	37	0	7.5 (0.3)	53.1 (3.0)	44.6 (2.7)	46.9 (3.0)	0.391 (0.002)	
		2	22.44(0.279)	83.8(2.58)	415.2(87.62)	16.2(2.057)	0.366 (0.096)	

Tabla 8. Resultados de MPs al 15 % p/v de polímero con y sin FNZ en H₂O, en términos de diámetro hidrodinámico (D_h), índice de polidispersidad (PDI) a 25°C y 37°C y Z-potencial (z-pot) a 25°C, medidos por DLS. Los cálculos son informados como la media ± DE.

Sistemas	T(°C)	FNZ	Dh (nm) (±S.D.)	PDI	z-pot negativos
F127:LPS (10% p/v)	25	0	546.6 (43.3)	0.317 (0.071)	15.5 (0.867)
		2	130.5 (6.30)	0.309 (0.011)	26.4 (0.530)
	37	0	160.3 (51.8)	0.324 (0.086)	
		2	760.6 (39.3)	0.654 (0.127)	
T1307:LPS (10% p/v)	25	0	523.5 (52.6)	0.644 (0.130)	17.3 (1.12)
		2	628.1 (67.5)	0.620 (0.120)	24.8 (0.290)
	37	0	631.1 (34.2)	0.653 (0.094)	
		2	947.5 (59.8)	0.678 (0.085)	
T1307-Glu:LPS(10%)	25	0	123.7 (5.89)	0.223 (0.005)	21.3 (0.327)
		2	126.6 (6.26)	0.290 (0.026)	27.6 (0.687)
F127-Glu:LPS(10%)	25	0	948.2 (4.69)	0.622 (0.032)	0.34 (0.005)
		2	1128.5 (11.63)	0.386 (0.040)	17.6 (0.150)
T1307:F127:LPS(15% p/v)	25	0	136.4 (2.44)	0.225 (0.007)	13.4 (1.20)
		2	122.5 (6.84)	0.279 (0.038)	7.76 (0.480)
LPS cc lote (1/50)	25	0	105.9 (3.93)	0.185 (0.018)	37.2 (1.2)
		2	117.4 (6.26)	0.282 (0.022)	40.0 (0.56)
	37	0	107.3 (8.11)	0.184 (0.009)	
		2	120.3 (7.01)	0.302 (0.016)	

Tabla 9. Resultados de mezclas de MPs con LPS al 10 % p/v de polímero con y sin FNZ, en términos de diámetro hidrodinámico (D_h), índice de polidispersidad (PDI) a 25°C y 37°C y Z-potencial (z-pot) a 25°C, medidos por DLS. Los cálculos son informados como la media ± DE.

Sistemas	fs ^a (±DE)	FNZ unido MPs (µg/mL) (±DE)	D _h ^b (nm) (±DE)	PDI ^c (±DE)	Z-Pot ^d (mV) (±DE)
F127 (15% w/v) LPS/FNZ	8.3(1.6)	1733(72)	130.5 (6.30)	0.309(0.011)	-26.4(0.5)
F127-Glu(15% w/v)/FNZ	9.1(2.1)	1890 (25)	700(63.8)	0.335 (0.054)	-1.59(0.2)
T1307(15% w/v)/FNZ	9.47(1.6)	1970 (31)	984.0 (55.0)	0.557 (0.113)	-3.31(0.7)
T1307-Glu(15% w/v)/FNZ	7.8(1.8)	1494 (78)	511(54.4)	0.213 (0.077)	-1.93(0.5)
F127:T1307 (15% w/v) /FNZ	13.5 (1.2)	2806 (142)	59.7 (2.11)	0.180 (0.077)	-2.78(0.3)

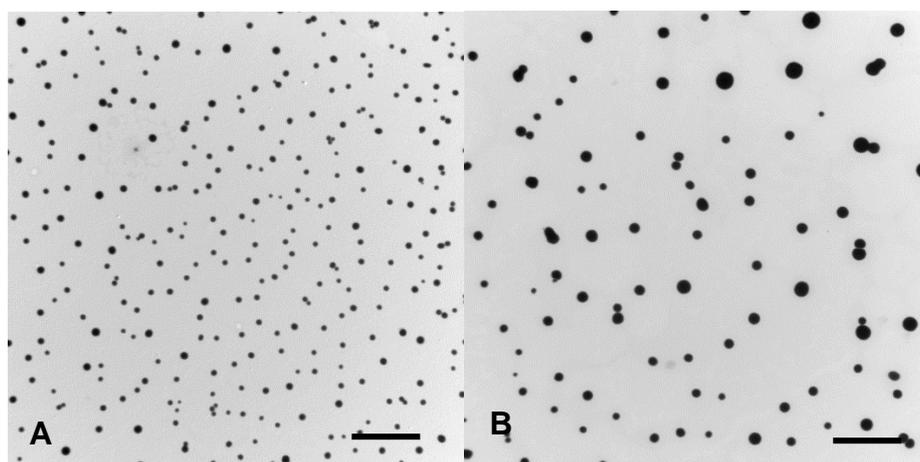
Tabla 10. Resumen de los resultados de MPs y mezclas de MPs con LPS en H₂O del ^afactor de solubilidad (fs) calculado como sFNZ encap/ sFNZ libre, ^bdiámetro hidrodinámico (D_h), ^c Índice de polidispersidad (PDI) y ^d potencial zeta (Z-pot) a 25°C. Los cuales han sido seleccionados a ensayar en TEM, AMES e *in vivo*. Los resultados son informados como la media con su desviación estándar (±DE).

4.5. Estudios morfológicos: TEM y AFM de los nanosistemas

Para el estudio por TEM, se seleccionaron a partir del estudio de DLS, algunas nanoestructuras con características promisorias de estabilidad (en cuanto a carga) y tamaño (ver **Tabla 10**). Las cuales fueron T1307 (15% p/v), F127 LPS, T1307:F127 (15% p/v), F127-Glu (15% p/v) y T1307-Glu (15% p/v).

De este modo se completó la caracterización de dichas MPs y mezclas MPs con LPS (con y sin FNZ), por una técnica complementaria al DLS, y que brinda información morfológica de la muestra. Es así que se observaron tamaños nanométricos y estructuras esféricas (ver **Figura 21 A-H y 21 A-D**), por lo que se continuaron con T1307 (15% p/v), F127 LPS, T1307:F127 (15% p/v), F127-Glu (15% p/v) y T1307-Glu (15% p/v) para posteriores estudios.

Se observó una correlación con los tamaños reportados por DLS (ver apartado anterior), por lo que se continuaron con T1307, F127 LPS, T1307:F127, F127-Glu y T1307-Glu para posteriores estudios *in vitro/in vivo*, hacia el ensayo de los mismos como agentes antitumorales.



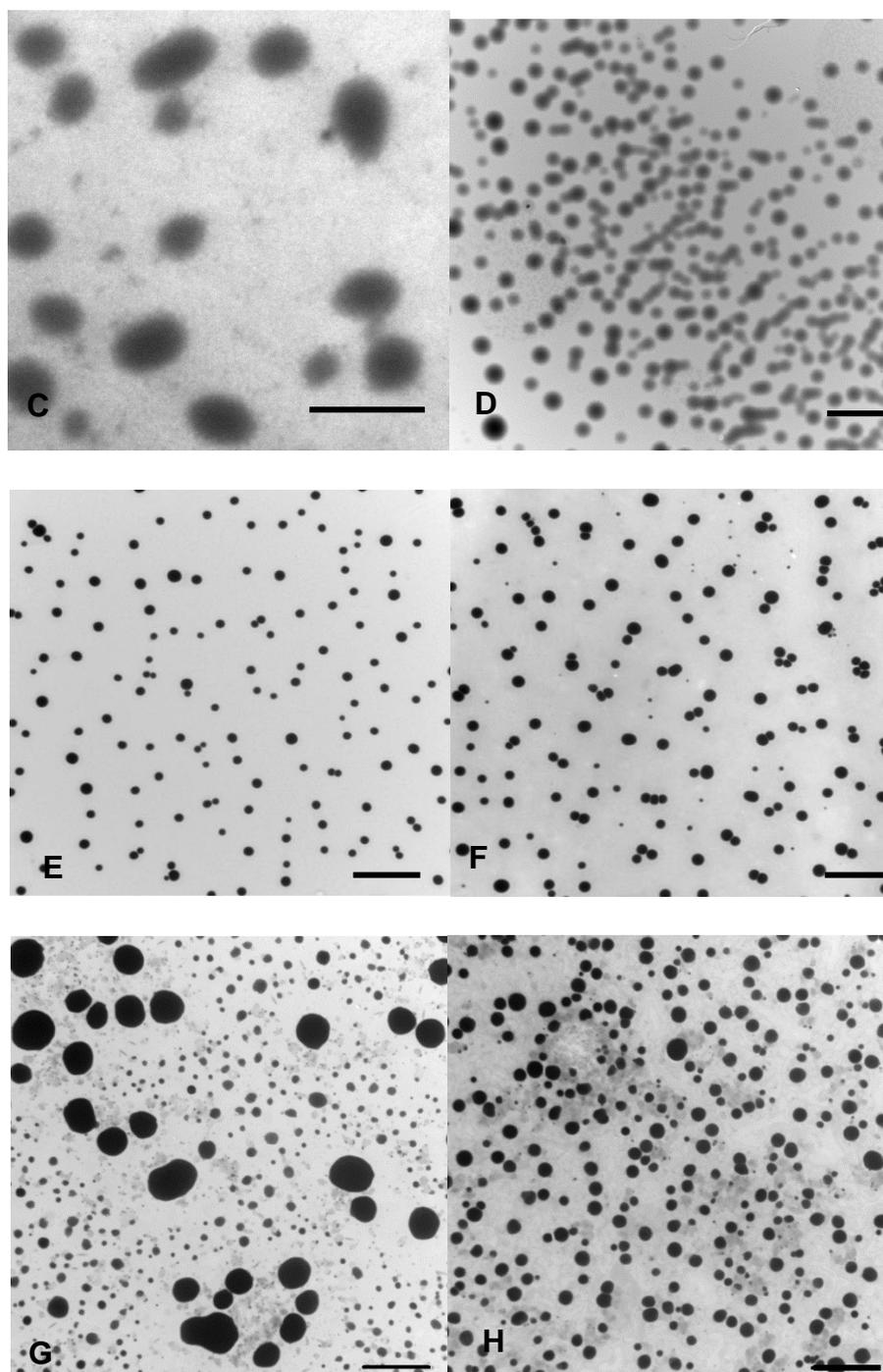


Figura 21. Microscopías electrónicas TEM de T1307:F127 (A), T1307:F127/FNZ (B), T1307-Glu (C), T1307-Glu/FNZ (D), F127-Glu (E), F127-glu/FNZ (F), F127 LPS (G) y F127 LPS/FNZ (H). Barras de escala: 2 μ m.

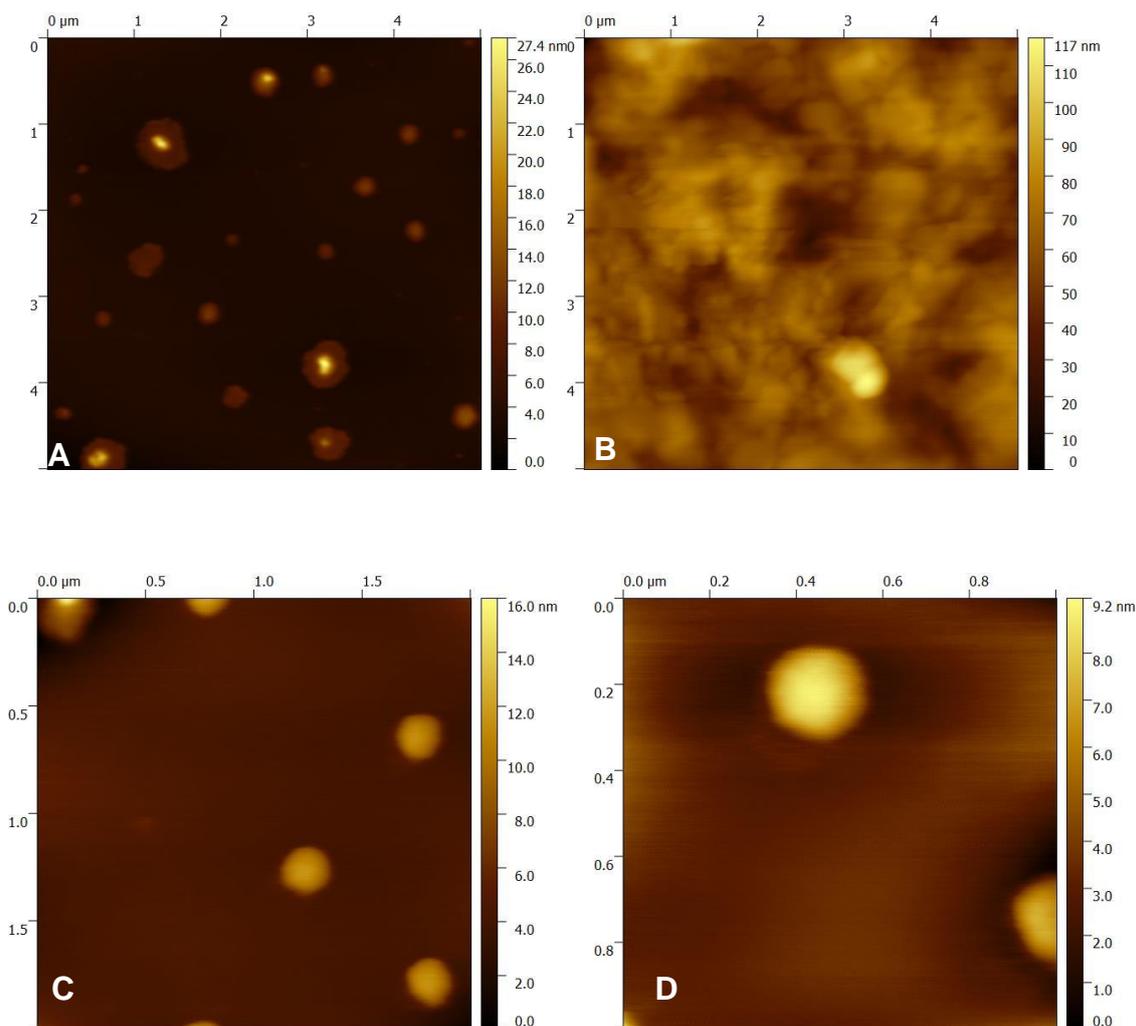


Figura 22. Microscopías AFM de: T1307-Glu (A), T1307-Glu/FNZ (B), F127-Glu (C), F127-Glu/FNZ (D).

4.6. Ensayos de liberación *in vitro* de FNZ desde las MPs y MPs-mezclas

El proceso de liberación de un fármaco como la FNZ oculto dentro de un sistema de liberación como los de la presente tesis, puede realizarse por diversos mecanismos, como difusión y/o relajación o hinchamiento de las cadenas poliméricas de poloxameros y poloxaminas.

La difusión ocurre cuando atraviesa el polímero que forma el sistema de liberación, estimulado por el gradiente de concentración que existe entre el sistema de liberación y el medio. Cuando el proceso de liberación se da

mediante un proceso controlado por el hinchamiento de un polímero, el sistema polimérico sufre una transición vítrea y se forma un hidrogel. FNZ estaría en un proceso relacionado con la difusión desde y a través de dicho polímero, bajo difusión a contracorriente de agua hacia el interior del polímero. En ambos casos los perfiles de liberación de estos sistemas se caracterizan por presentar una disminución de la velocidad de liberación con el tiempo, que se relaciona con la mayor distancia que tiene que recorrer la FNZ dentro de la matriz.

La liberación *in vitro* de FNZ de las nanoformulaciones de MPs y mezclas de MPs se representan en la **Figura 23 y 24 A-F** y se realizaron en base a estudios de liberación descritos (**131, 157**).

Se analizaron los perfiles de liberación, en base a los ajustes matemáticos de orden cero, orden uno, Higuchi y Krosmeier- Peppas (**131-133, 157**).

Para la caracterización de los estudios de cinética de liberación y para determinar el mecanismo de liberación del fármaco, los resultados de los estudios *in vitro* se ajustaron a varios modelos de cinética de la siguiente manera.

Ecuación para ajuste orden cero:

$$Q_t = K_0 t$$

Donde, Q_t es la cantidad (tasa) de fármaco liberado acumulado en disolución, K_0 es constante de liberación de orden cero y t es al tiempo de estudio.

Ecuación de tasa de primer orden:

$$\ln (100-(Q_t)) = - K_1 t$$

donde Q_t es la cantidad (tasa) de fármaco liberado acumulado en disolución, K_1 es la constante de liberación de primer orden y t es el tiempo.

Modelo de Higuchi:

$$Q_t = K_H t^{1/2},$$

Donde Q_t es la cantidad (tasa) de fármaco liberado acumulado en disolución, K_H es la constante de liberación de Higuchi y $t^{1/2}$ es la raíz del tiempo.

El modelo Korsmeyer – Peppas es un modelo semiempírico genérico, el cual permite predecir el mecanismo de liberación.

$$Q_t = K_{kp} t^n$$

Donde Q_t es la cantidad (tasa) de fármaco liberado acumulado en disolución, t es tiempo, K_{kp} es la constante incorporación de caracteres estructurales y geométricos del dispositivo de liberación y n es el exponente de liberación, indicativo del mecanismo de liberación de fármacos.

Para determinar n , se usó la fracción de liberación de la curva de $Q_t \leq 60\%$, basado en datos morfológicos por TEM y AFM, por lo que las partículas fueron consideradas como esferas.

Se observa cuál de las aproximaciones presenta una mejor correlación (R^2) y se reportara cual es el mecanismo al cual se adecua cada nanoformulación (ver **Tabla 11**).

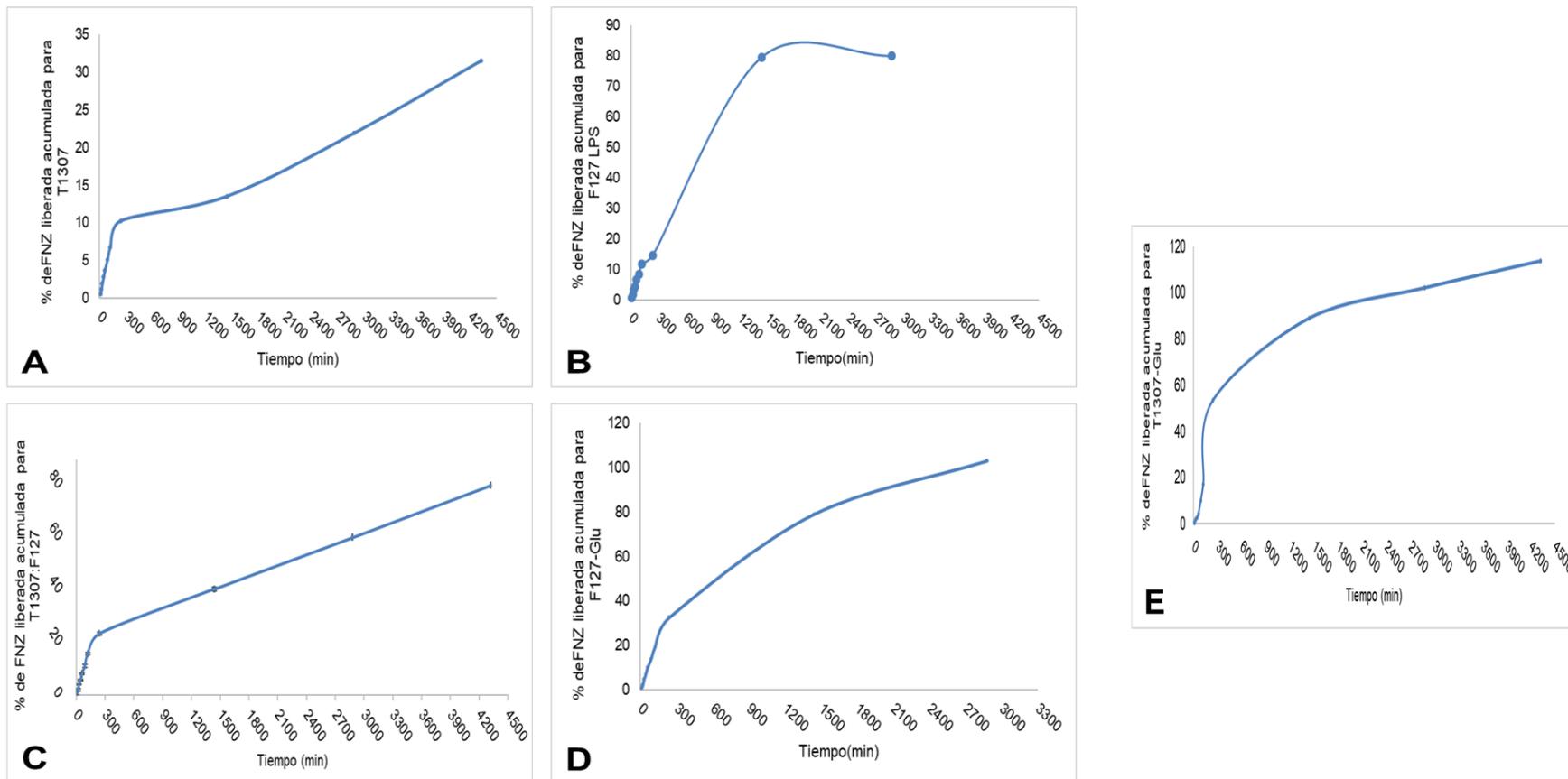


Figura 23. Perfiles de liberación de FNZ a 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 1440, 2880 y 4320 minutos en el caso de T1307 (15% p/v) (A), F127 LPS (10X)(B), T1307:F127 (15% p/v) (C), F127-Glu(15% p/v) (D), y T1307-Glu (15% p/v) (E). Todas las preparaciones se ensayaron a una concentración de 2 mg/mL de FNZ. *Notar que en algunos casos no se siguió hasta 4320 minutos ya que la liberación llegó al 100 % a tiempos menores*

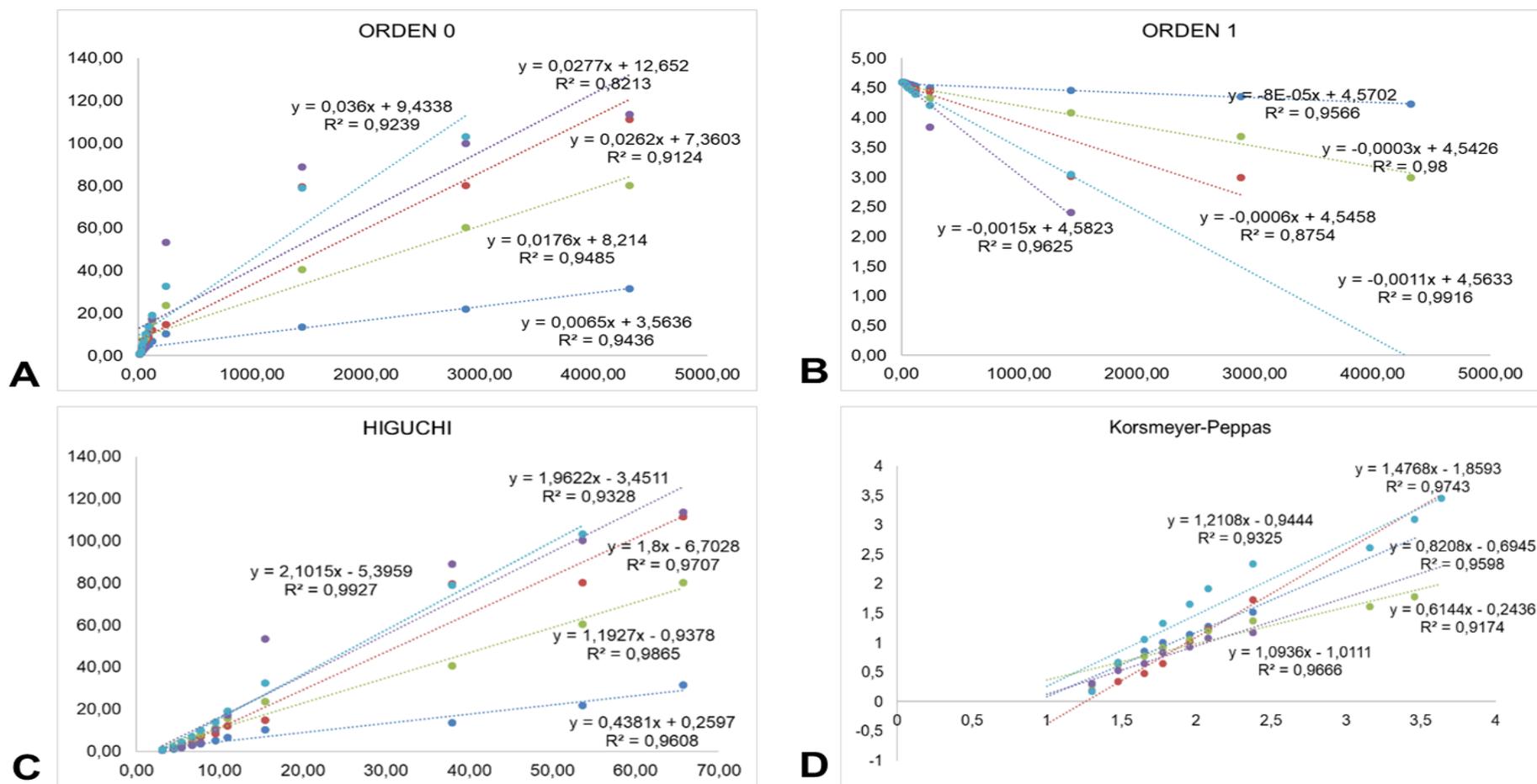


Figura 24. Estudio de los diversos modelos matemáticos de ajuste para el análisis del mecanismo de liberación de la FNZ a partir de ajuste orden 0(A), orden 1 (B), Higuchi (C) y kormmeyer-peppas (D) (n=3). Dichos ajustes están con su ecuación de la recta para cada nanosistema y con su coeficiente de correlacion (R^2).

Formulación	Orden 0		Orden 1		Higuchi		Korsmeyer-Peppas	
	R ²	K	R ²	K	R ²	K	R ²	N
T1307/FNZ	0.9436	0.0065	0.9566	-0.00005	0.9608	0.4381	0.9325	1.21
F127 LPS/FNZ	0.8684	0.0307	0.8754	-0.0006	0.9707	1.8	0.9598	0.82
T1307:F127/FNZ	0.9485	0.0176	0.9800	-0.0003	0.9865	1.1927	0.9174	0.61
F127-Glu/FNZ	0.9239	0.0360	0.9916	-0.0011	0.9216	1.9622	0.9743	1.47
T1307-Glu/FNZ	0.8220	0.0279	0.9625	-0.0015	0.9927	2.195	0.9666	1.09

Tabla 11. Ajustes de regresión en Excel. Se informa constante cinética (según corresponda orden cero, uno y Higuchi) y cálculo del exponente n y constante de Kornmeyer-Peppas.

4.7. Test de toxicidad *in vitro*

A modo de analizar la toxicidad *in vitro* tal como lo recomienda la OECD, se realizó el ensayo de test de AMES para la FNZ y las MPs/ mezclas de MPs vacías (T1307(15% p/v), F127 LPS(10X), T1307:F127(15% p/v), F127-Glu(15% p/v) y T1307-Glu(15% p/v)) y MPs/ mezclas de MPs con FNZ encapsulado (T1307/FNZ(15% p/v), F127 LPS/FNZ(10X), T1307:F127(15% p/v)/FNZ, F127-Glu(15% p/v)/FNZ y T1307-Glu(15% p/v)/FNZ) que resultaron ser más promisorias por caracterización a través de DLS y TEM.

Como se indica en la sección experimental, la muestra se consideró mutagénica cuando el número de colonias revertidas fue al menos el doble que del control negativo durante al menos dos niveles de dosis consecutivos (**98, 130**).

Todas las muestras ensayadas presentaron mutagenicidad sin activación metabólica (S9), pero en distinto grado de poder mutagénico (ver **Tabla 12 y Figura 25**).

Cabe destacar, que se sembraron placas con las diferentes cepas y las concentraciones de DMSO ensayadas, y no se observó ningún efecto sobre el crecimiento de las células por la presencia de dicho disolvente. Así mismo, todos los nanovehículos a concentraciones máximas de 5000 mg por placas (y sus diluciones al tercio) y resultaron no mutagénicas (ver **anexos, test de AMES**).

Nanoformulación	Dosis (ug/placa de FNZ)	Promedio del número de colonias (\pm DE) SIN S9				
		CEPA TA 98	CEPA TA 100	CEPA TA 1535	CEPA TA 1537	CEPA TA 102
FNZ	1.5	137 (13)	395 (24)	40 (4)	52 (3)	428 (14)
	0.5	99 (30)	346 (18)	30 (3)	47.5 (0.5)	427.5 (0.7)
	0.16	31 (10)	300 (15)	32 (1)	45 (5)	407 (3)
	0.05	14 (2)	272 (6)	35 (9)	31.5 (2.1)	391(3)
	0.018	10.5 (0.5)	259 (3)	20 (6)	21.5(3.5)	379 (1)
	0	8.6(0.5)	86(2.5)	12.6(1.3)	14.6(2.7)	201.6(2.9)
T1307/FNZ	10	72.5 (2.5)	187 (2)	40 (4)	48 (2)	452.5 (3.5)
	3.3	67.5 (1.5)	178 (2)	30 (3)	43 (2)	442 (3)
	1.1	54.5 (1.5)	179 (4)	32 (1)	37.5 (0.5)	435 (2)
	0.3	45 (4)	170.5 (3.5)	35 (9)	30.5 (3.5)	428.5 (2.5)
	0.12	28 (1)	163.5 (4.5)	20 (6)	22.5 (1.5)	427 (1)
	0	8.6(0.5)	86(2.5)	12.6(1.3)	14.6(2.7)	201.6(2.9)
	3	143 (4)	185 (6)	72.5 (1.5)	63.5 (0.5)	573 (1)

F127:T1307 /FNZ	1	81 (7)	179.5 (2.5)	65 (2)	54.5 (2.5)	559 (5.5)
	0.33	61.7 (6.5)	170.5 (1.5)	62.5 (2.5)	48.5 (1.5)	556 (4)
	0.11	28.5 (3.5)	171 (8)	56 (3)	46 (3)	551 (2)
	0.03	19.5 (0.5)	153.5 (4.5)	48.5 (0.5)	38.5 (0.5)	539.5 (1.5)
	0	8.6(0.5)	86(2.5)	12.6(1.3)	14.6(2.7)	201.6(2.9)
	30	0	0	56.5 (2.5)	41.5 (2.5)	546.5 (2.5)
F127-glu/FNZ	10	25 (4)	76 (4)	43 (2)	33 (2)	543 (2)
	3.3	59.5 (3.5)	120.6 (6.5)	37.5 (0.5)	27.5 (0.5)	538.5 (0.5)
	1.1	19.5 (2.5)	106.5 (5.5)	28 (1)	23 (4)	530.5 (3.5)
	0.3	38 (2)	92.5 (14.5)	20 (1)	12 (3)	525 (4)
	0	8.6(0.5)	86(2.5)	12.6(1.3)	14.6(2.7)	201.6(2.9)
	30	68 (4)	186.5 (4.5)	89.5 (0.5)	54.5 (0.5)	562 (3)
T1307-Glu/FNZ	10	62 (1)	180 (9)	76 (2)	39.5 (1.5)	549.5 (1.5)
	3.3	60.5 (2.5)	128 (7)	66 (3)	35 (4)	540.5 (1.5)
	1.1	44 (3)	170.7 (3.5)	61 (1)	31 (1)	531.5 (2.5)
	0.3	35 (1)	165 (4)	52 (1)	22 (1)	520.5 (2.5)
	0	8.6(0.5)	86(2.5)	12.6(1.3)	14.6(2.7)	201.6(2.9)

Tabla 12. Número de colonias mutantes de *Salmonella typhimurium* tratado en distintas condiciones sin activación metabólica (S9). Lo informado son los promedios de las colonias en función de la

concentración de FNZ en cada caso MPs/ mezclas de MPs con FNZ encapsulada (T1307/FNZ (15% p/v), F127 LPS/FNZ (10X), T1307:F127/FNZ (15% p/v), F127-Glu/FNZ (15% p/v) y T1307-Glu/FNZ(15% p/v)) con su correspondiente \pm DE(n=3).

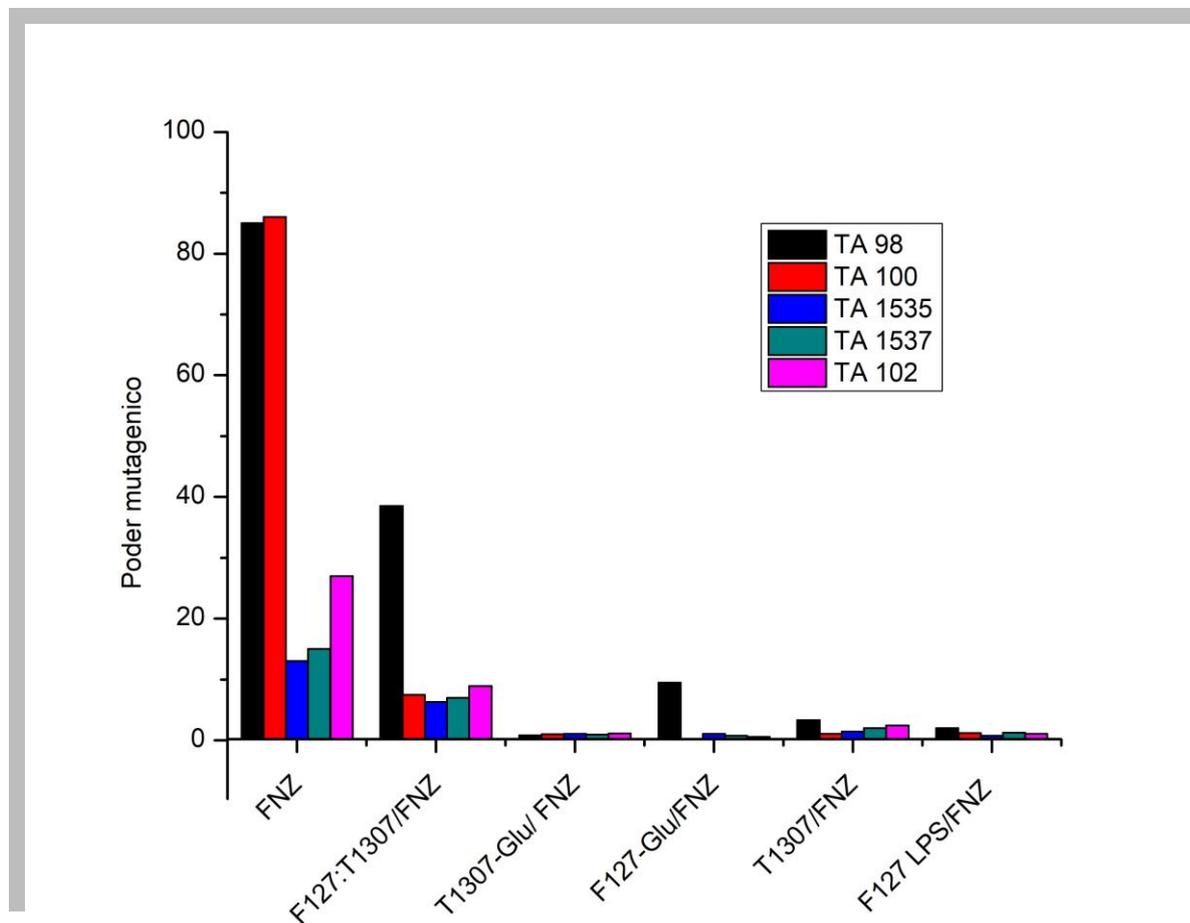


Figura 25. Gráficos de poder mutagénico en función de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA102, TA100, TA98, TA 1535 Y TA 1537 sin activación metabólica a las 48 horas de exposición con las distintas formulaciones nanoestructuradas (T1307 (15% p/v), F127 LPS (10% p/v), T1307:F127 (15% p/v), F127-Glu (15% p/v) y T1307-Glu (15% p/v) con FNZ encapsulado).

4.8. Generalidades para los ensayos *in vivo* en animales BALB/c

4.8.1. Vías de administración de fármacos para estudios *in vivo*

Se seleccionó la vía óptima a emplear (**102, 103**) en nuestro caso la IP/IV en base a nuestro potencial desarrollo para así lograr tener la cantidad de fármaco en circulación/ potencial agente diagnóstico.

4.8.2. Estudio de toxicidad aguda (Test del –Up and Down-)

Se realizó toxicidad aguda por vía IP de forma de analizar todas las formulaciones desarrolladas y seleccionadas como promisorias. Dicho estudio mostró que la FNZ encapsulada en todas las formulaciones (T1307(15% p/v), F127 LPS(10X), T1307:F127(15% p/v), F127-Glu(15% p/v) y T1307-Glu(15% p/v) con FNZ) presentan dosis máximas toleradas superiores a 2000 mg/kg de masa corporal de ratón (ver **Tabla 13**). Lo que demuestra una mejora importante en la toxicidad con respecto a la FNZ libre, en la cual se obtuvo una dosis máxima de 1500 mg/kg de masa corporal de ratón (ver **Tabla 13**).

	LD ₅₀ (mg/kg)	Test de Irwin ^{a,b}	Alteraciones en las necropsias ^c
DMSO/FNZ	1500	(+)	(-)
T1307/FNZ	> 2000	(+)	(-)
F127 LPS/FNZ	> 2000	(+)	(-)
T1307:F127/FNZ	> 2000	(+)	(-)
F127-Glu/FNZ	> 2000	(+)	(-)
T1307-Glu/FNZ	> 2000	(+)	(-)

Tabla 13. Resumen del estudio de test *Up-and-Down* con los diferentes tratamientos con las nanoformulaciones de MPs y mezclas de MPs con LPS (T1307 (15% p/v), F127 LPS (10X),

T1307:F127 (15% p/v), F127-Glu (15% p/v) y T1307-Glu (15% p/v). ^a (130,133); ^b La prueba se realizó a las 0.5, 1.5, 3, 5, 12, 24, 48 y 72 horas después de la administración IP. Si todos los parámetros analizados fueron similares al tratamiento con PBS, se marcó como (+); de lo contrario, se marcó como (-); ^c (-) denota ausencia de alteraciones o adherencias de órganos.

Asimismo, el análisis macroscópico luego de la necropsia demuestra que no hay adherencias, ni cambios macroscópicos fisiológicos aparentes luego de la posología de los tratamientos realizados.

Por lo que dichos resultados impulsan a los estudios de tratamiento con las distintas MPs y mezclas de MPs seleccionados como nanovehículos de FNZ para el tratamiento del cáncer de mama a las posologías seleccionadas de 20 y 200 mg/kg en peso de ratón BALB/c (103).

4.8.3. Actividad antitumoral de FNZ cargada en MPs

Se evaluó el porcentaje de inhibición del tamaño tumoral (%ITT) con cada tratamiento de MPs y mezclas de MPs con FNZ a las concentraciones propuestas como forma de analizar la capacidad antitumoral de la droga vehiculizada en los diferentes nanosistemas (146). Asimismo se masaron tumores y a su vez análisis clínicos (bioquímicos y hematológicos) de los animales al finalizar los tratamientos, para estudiar los efectos de todo el tratamiento.

La actividad antitumoral de FNZ se evaluó en MPs y mezclas de MPs (T1307(15% p/v), F127 LPS(10X), T1307:F127(15% p/v), F127-Glu(15% p/v) y T1307-Glu(15% p/v)) con FNZ a dos concentraciones de FNZ: 20 mg y 200 mg/kg de masa corporal de ratón. Por lo que se prepararon formulaciones de nanopartículas en la máxima capacidad de solubilidad del fármaco (20 mg/kg), a las cuales llamaremos nanoformulaciones; y en nanosuspensiones cuando se superó la máxima solubilidad de FNZ (200 mg/kg).

Se visualizó una inhibición del crecimiento a nivel tumoral en todos los sistemas analizados (ver **Figura 26, 27 y 28**).

Para las MPs glucosiladas, se observa una caída del crecimiento tumoral con respecto al control generándose una inhibición de 54 % para F127-Glu/FNZ y del 21 % para T1307-Glu/FNZ a una concentración de 200 mg/kg de FNZ (ver **Figura 27**) al final del estudio. Lo mismo para para tratamiento de 20 mg/kg donde hay una inhibición del 23.6 % para F127-glu y del 45.8 % para T1307-Glu (ver **Figura 26**). Las diferencias son significativas, aplicando test *t* de Student al final del tratamiento, con un *p* valor ≤ 0.05 , entre los grupos de T1307 (15% p/v)/FNZ, T1307:F127 (15% p/v)/FNZ, F127-Glu (15% p/v)/FNZ y T1307-Glu (15% p/v)/FNZ y el control. Mientras que para F127 LPS (10X)/FNZ no se encontraron diferencias.

Luego del sacrificio de los animales, se realizó las medidas de peso tumorales correspondientes (ver **Figura 29**), donde se observó cierta correlación.

Finalmente, se analizó la sobrevida de los animales en todo el tratamiento, utilizando el método Kaplan-Meier (**158, 159**). El cual se basa en el estudio de intervalos definidos de ocurrencia del evento en individuos independientes en un tiempo *t* determinado. Asimismo, si se desea comparar dos curvas de supervivencia, la prueba estadística no paramétrica de log-rank (o rango logaritmico) es una de las más usadas y empleada en la presente tesis. La prueba compara supervivencia entre grupos "tratamiento", que evalúa si las curvas de supervivencia son idénticas (superpuestas) o no. Las curvas de supervivencia se estiman para cada grupo, consideradas por separado, si el X^2 es mayor a 3.84, se refuta la hipótesis nula (H_0) que indica que las curvas de supervivencia "en estudio" son diferentes. Dicho test es especialmente útil en estudios con número pequeño de animales (**159**).

Dicho análisis arrojó que la sobrevida de los animales post tratamiento con las diferentes nanoformulaciones, demuestran una buena performance, con mayores tiempos de sobrevida de las MPs, en algunos casos de 100% (T1307-Glu/FNZ y T1307:F127/FNZ), frente a posologías del fármaco FNZ en una dispersión de suero fisiológico (SF) y tween 80 (T) (3:1) (ver **Figura 30**). Asimismo, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos luego de los 10 días del inicio con los diferentes tratamientos.

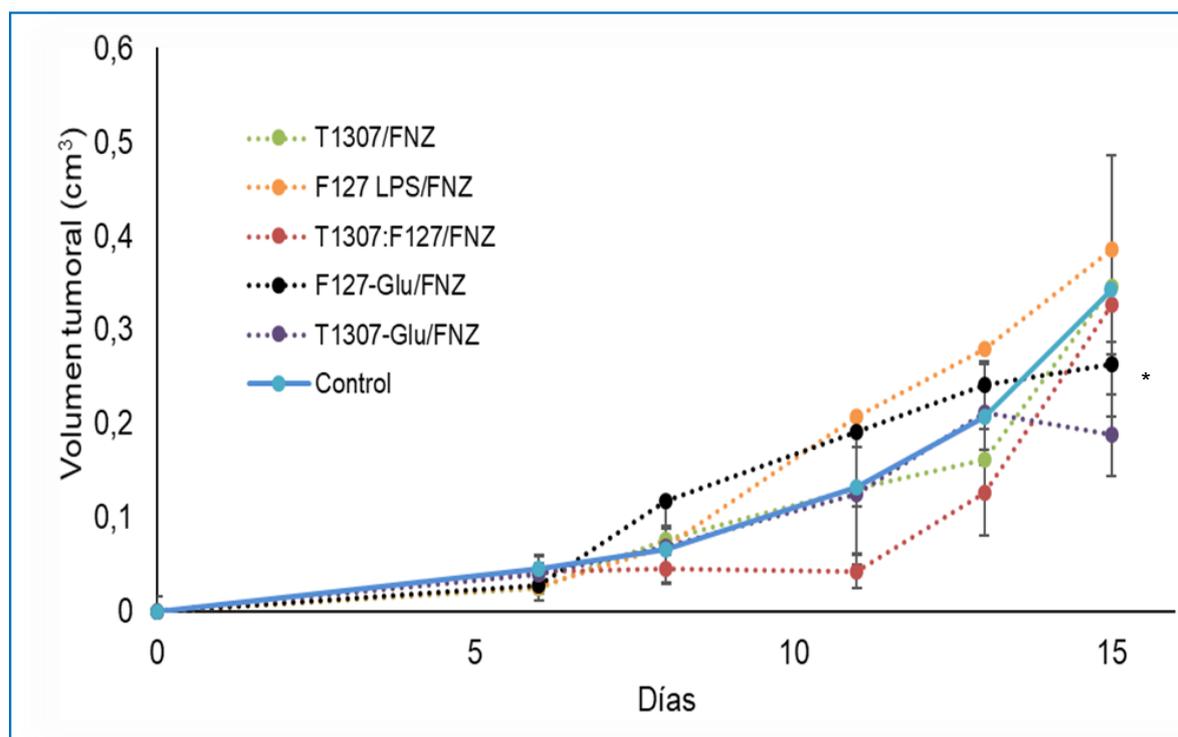


Figura 26. Evolución de los tamaños tumorales en los diferentes tratamientos con las nanoformulaciones de MPs y mezclas de MPs con LPS (T1307 (15% p/v), F127 LPS (10 % p/v), T1307:F127 (15 % p/v), F127-Glu (15 % p/v) y T1307-Glu (15 % p/v)) con una posología de 20 mg/kg de FNZ, inyección IP en agua milli-Q (control). * son significativas las diferencias entre los tratamientos, aplicando test t de Student al final del tratamiento, con un p valor ≤ 0.05 .

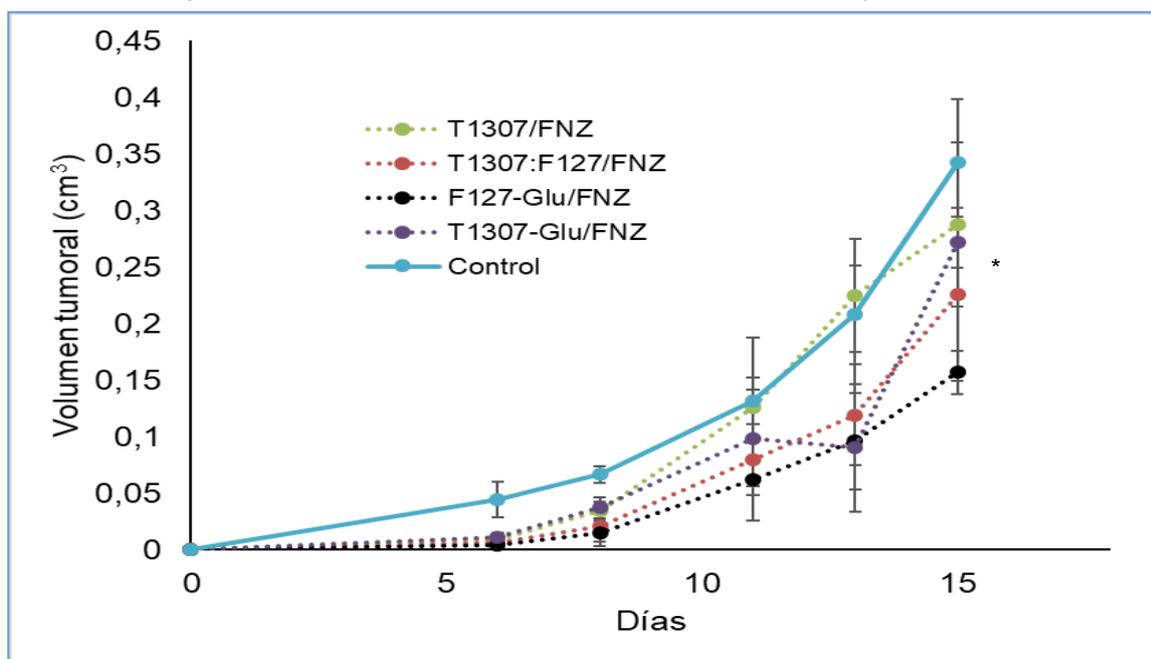
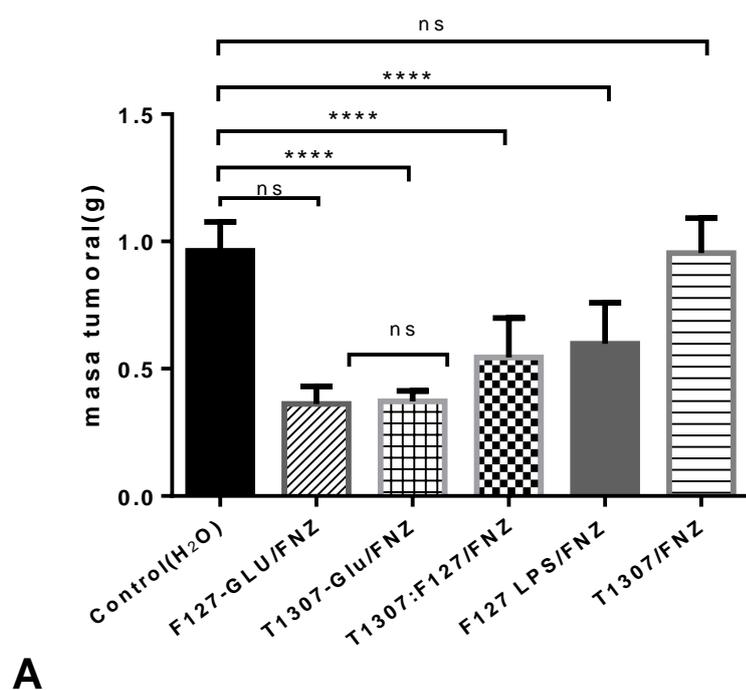


Figura 27. Evolución de los tamaños tumorales en los diferentes tratamientos con agua milli-Q (control), las nanosuspensiones de MPs y mezclas de MPs (T1307 (15% p/v), T1307:F127 (15% p/v), F127-Glu (15% p/v) y T1307-Glu (15% p/v)) con una posología de 200 mg/kg de FNZ, inyección IP. * son significativas las diferencias entre los tratamientos, aplicando test t de Student al final del tratamiento, con un p valor ≤ 0.05 .



Figura 28. Fotografía ilustrativa representativa ex vivo de los tumores, post tratamiento con agua milli-Q (A) y de las nanoformulaciones de MPs/FNZ y mezclas de MPs con LPS/FNZ control sin tratamiento (A), F127-Glu(15% p/v) (B), T1307-Glu(15% p/v) (C), T1307:F127(15% p/v) (D), (T1307(15% p/v) (E) y F127 LPS(10% p/v)/FNZ(F) con una posología de 20 mg/kg de FNZ, inyección IP. Cabe destacar que el tumor post tratamiento F127 LPS(10% p/v)/FNZ(F), se presentaba desgranado (no sólido).



Tratamiento	Masas tumorales (\pm DE) (g)	Alteraciones en las Necropsias
Control (sin trat)	0.9633(0.114)	(+)
F127-Glu/FNZ	0.9539(0.138)	(+)
T1307-Glu/FNZ	0.5975(0.162)	(+)
T1307:F127/FNZ	0.5448(0.154)	(+)
F127 LPS/FNZ	0.3624(0.068)	(-)
T1307/FNZ	0.3716(0.042)	(+)

B

Figura 29. Análisis de las masas tumorales con los diferentes tratamientos, al finalizar los mismos, con las nanoformulaciones de MPs y mezclas de MPs con LPS (T1307(15% p/v), F127 LPS(10% p/v), T1307:F127(15% p/v), F127-Glu(15% p/v) y T1307-Glu(15% p/v) ($P < 0.05$, $\alpha=0.05$) (A). Si el tumor post tratamiento analizado se presentó sólido, se marcó como (+); de lo contrario, se marcó como (-)(B)(n=6, por tratamiento).****Reducción estadísticamente muy significativa del tamaño tumoral entre el control (tumor sin tratamiento) con las nanoformulaciones de MPs y mezclas de MPs con FNZ ($P < 0.05$, $\alpha=0.05$). ^{ns} no hay significancia estadística.

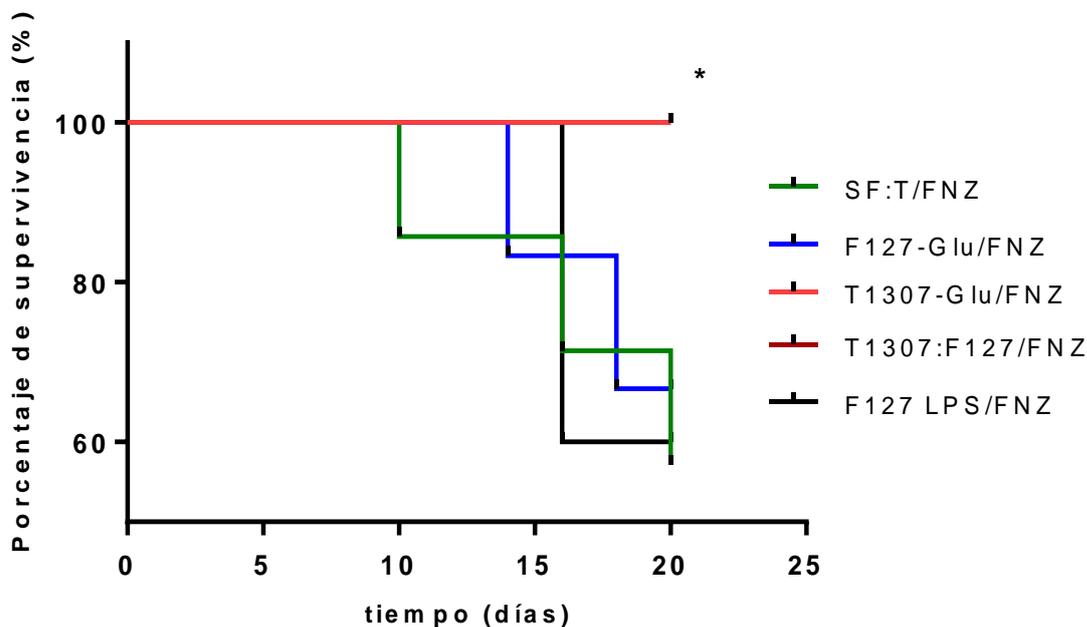


Figura 30. Análisis comparativo de las curvas de supervivencia de las nanoformulaciones de MPs/FNZ y dispersiones con suero fisiológico (SF) y tween 80 (T) (3:1), con una posología de 20 mg/kg de FNZ. El análisis comparativo de las curvas se llevó a cabo a partir del análisis de Kaplan-Meier con la prueba no paramétrica de log-rank con un $*p < 0.05$ (0.036), $X^2 > 3.84$ (6.818) ya descrita en experimental. * Reducción estadísticamente muy significativa de la supervivencia entre posologías de surfactantes convencionales (SF:T) con respecto a las nanoformulaciones de MPs y mezclas de MPs con FNZ.

Los análisis clínicos se realizaron con el fin de observar si el fármaco vehiculado cambiaba los parámetros normales de enzimas, glucosa, presencia de urea en sangre, entre otros. Se realizaron los análisis clínicos en sangre de animales post tratamiento con FNZ (20 mg/kg) encapsulada con T1307 (15% p/v), F127 LPS (10X), T1307:F127 (15% p/v), F127-Glu (15% p/v) y T1307-Glu (15% p/v). Para ello se extrajo un pool de sangre de los animales tratados y se analizaron inmediatamente para la obtención de los siguientes parámetros clínicos, hematológicos y bioquímicos (ver **Tabla 14 y 15**).

Valores bioquímicos BALB/c

Parámetro	Normales ^a	Normales ^b	Tumor	F127-glu/FNZ	F127:T1307/FNZ	T1307/FNZ	T1307-Glu/FNZ
Glicemia	0.83-2.81	1.8	0.49	0.74	0.79	1.16	0.82
Urea	0.07-0.34	0.34	0.48	0.34	0.32	0.39	0.40
Creatinina	0.2-0.5	0.22	0.12	0.16	0.28	0.18	0.22
GPT	40-170	36	147	145	39	57	18
GOT	67-381	115	637	364	102	215	122

Tabla 14. Valores obtenidos del análisis bioquímico en ratones BALB/c: sin tumor (normales), con tumor sin tratamiento y post tratamiento con las nanoformulaciones con FNZ (2 mg/mL) más promisorias.

^a Según (151, 152). ^b Animales sanos usados como controles en los experimentos realizados en esta tesis.

Valores hematológicos obtenidos de BALB/c

Parámetro	Normal ^a	Normal ^b (BALB/c)	Tumor	F127-glu/FNZ	F127:T1307/FNZ	T1307/FNZ	T1307-Glu/FNZ
Hematocrito	42.1- 67.0	42.2	40	27.0	43.8	39.5	45.6
Hemoglobina	10.0- 18.9	13.1	13.9	12.9	12.9	10.6	12.9
MCV	48.0- 64.1	49.3	51.5	49.7	52.3	51.8	49.1
MCH	13-17.6	16.8	92.3	19.3	15.4	14.0	13.9
MCHC	23.9- 33.1	34	30	47.8	29.4	26.9	28.2
Plaquetas	476- 1611	527	1000	876	1259	465	768

Neutrófilos	0.74-3.01	1.8	0.0	1.5	...	5.5	3.10
Eosinófilos	0.00-4.0	0.6	0.38	0.0	0.00	0.0	0.1
Basófilos	0.00-0.16	0.0	0.0	0.0	0.00	0.1	0.00
Monocitos	0.34-1.37	0.0	0.0	0.3	1.1	...	0.17

Tabla 15. Valores obtenidos del análisis hematológico (A) y bioquímico (B) en ratones BALB/c: sin tumor (normales), con tumor sin tratamiento y post tratamiento con las nanoformulaciones con FNZ (2 mg/mL).

^a Según (155,156). ^b Animales sanos empleados como controles en los experimentos realizados en esta tesis.

4.9. Marcación de FNZ, ^{99m}Tc(CO)₃-FNZ, y encapsulación en MPs

La preparación del complejo se realizó con éxito siguiendo la metodología descrita por Fernández *et al.* (104). En la **Figura 31** y **Tabla 17** se resumen los resultados de este proceso.

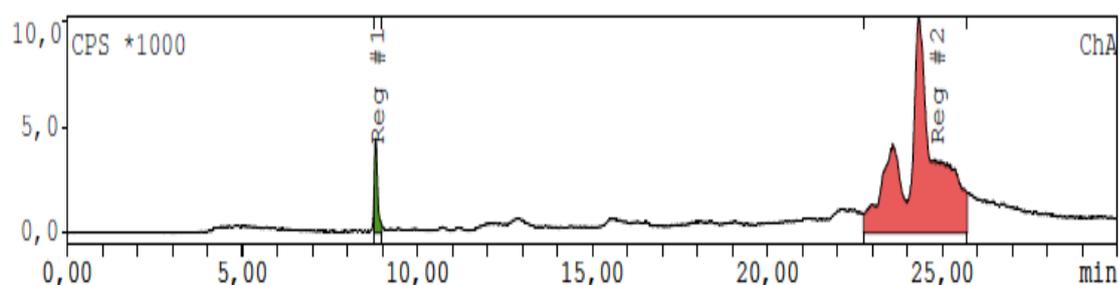


Figura 31. Perfil de HPLC obtenido para la complejación de FNZ y ^{99m}Tc y su porcentaje relativo, así como las impurezas. La pureza radioquímica se obtiene a partir de la integración en el gráfico.

Sustancia	Tiempo de retención (min) (\pm DE)	Área (cuentas)	%PR
Impurezas	8.82(1.2)	28043.7	4.60
$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$	24.33(0.9)	581270.2	95.40

Tabla 16. Resultados en base a lo obtenido por ITLC y HPLC para $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ con su desviación estándar (\pm DE).

4.9.1. Estudios de biodistribución de $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ en MPs T1307 y T1307-Glu en ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1

Se procedió a los estudios de imagen y biodistribución en ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1. Se inyectó por vía IV $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ (en DMSO: PBS) y $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}/\text{MPs}$ para analizar la distribución de $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ en el cuerpo del ratón después de la implantación de tumores (día 5).

Se tomaron imágenes a 1 y 2 horas post Inyección IV, *in vivo* en el equipo FX PRO donde se observa una alta captación por parte del tumor de mama implantado (ver **Figura 32**). Posteriormente se sacrificó un grupo de ratones después de 1 hora (n = 4) y 2 horas (n = 4), y se procede a la masada y medición de la radioactividad en los órganos y tejidos en un equipo ORTEC a esos intervalos de tiempo fijos (ver **Figura 33 y 34**).

Se calculó el porcentaje de absorción media por tejido y se generaron relaciones de captación para obtener % de actividad/g. Los órganos y tejidos cuyas actividades se midieron fueron sangre, hígado, corazón, pulmones, bazo, riñones, tiroides, músculo, hueso, intestino, y tumor. Estos se compararon con los resultados obtenidos del $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ de la tesina de grado de Joaquín Afonso.

En las biodistribuciones de $\text{MPs}/^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ no se observa una preferencia por el hígado en ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1.

Se procedió al análisis de las relaciones entre los tumores con músculo a 1 y 2 horas post inyección IV (ver **Tabla 17**).

La relación tumor/músculo fue claramente favorable hacia el tumor por al menos 1 hora.

Después de 2 horas post inyección, la relación tumor/musculo disminuye sustancialmente, a relación de captación de 10 veces menos para las formulaciones de T1307-Glu y para T1307 disminuye levemente.

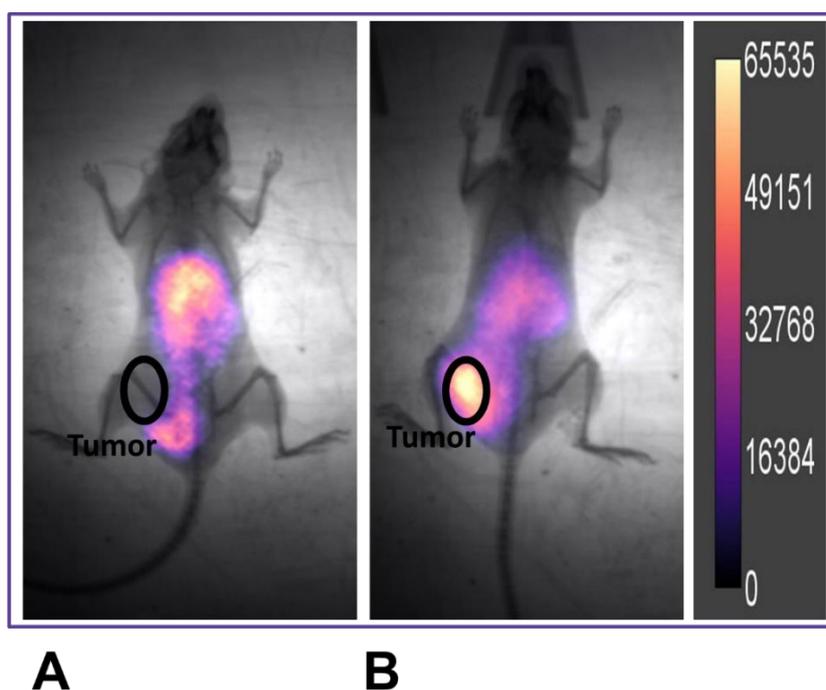


Figura 32. Imágenes representativas *in vivo* de rayos X y gamma post inoculación IV de $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ (A) y la nanoformulación T1307-Glu / $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ (B) en ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1 a 1 hora post inyección. La intensidad de rayos gamma se muestra en unidades arbitrarias (a.u.) (ver barra de color) obtenida del equipo bruker in vivo FX PRO. (n=4, por formulación).

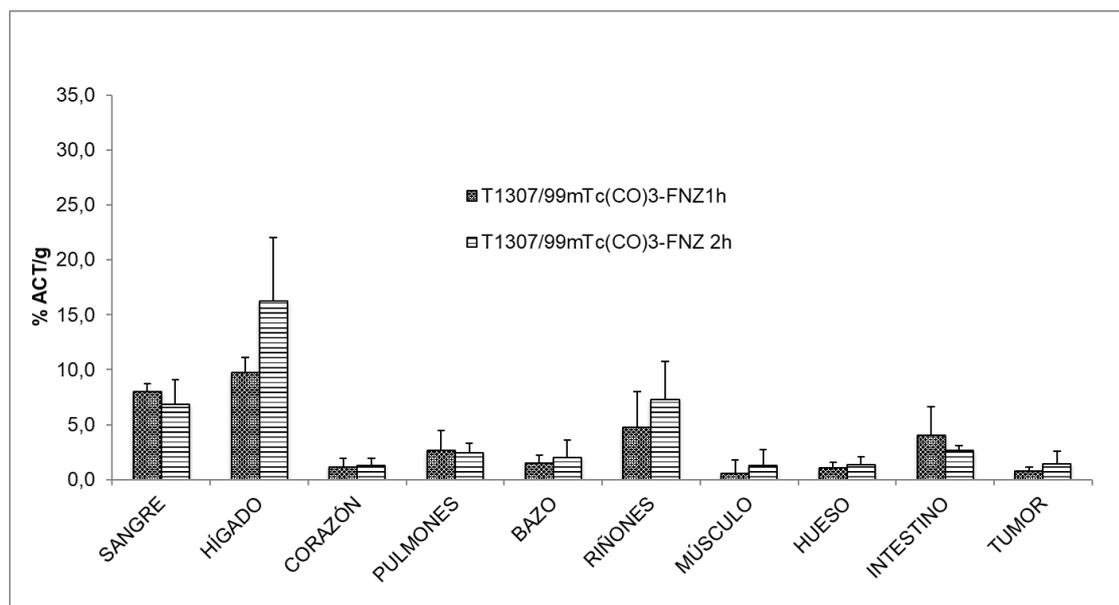


Figura 33. Biodistribución de T1307 /^{99m}Tc(CO)₃-FNZ a 1 y 2 horas post inyección IV en ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1(n=4).

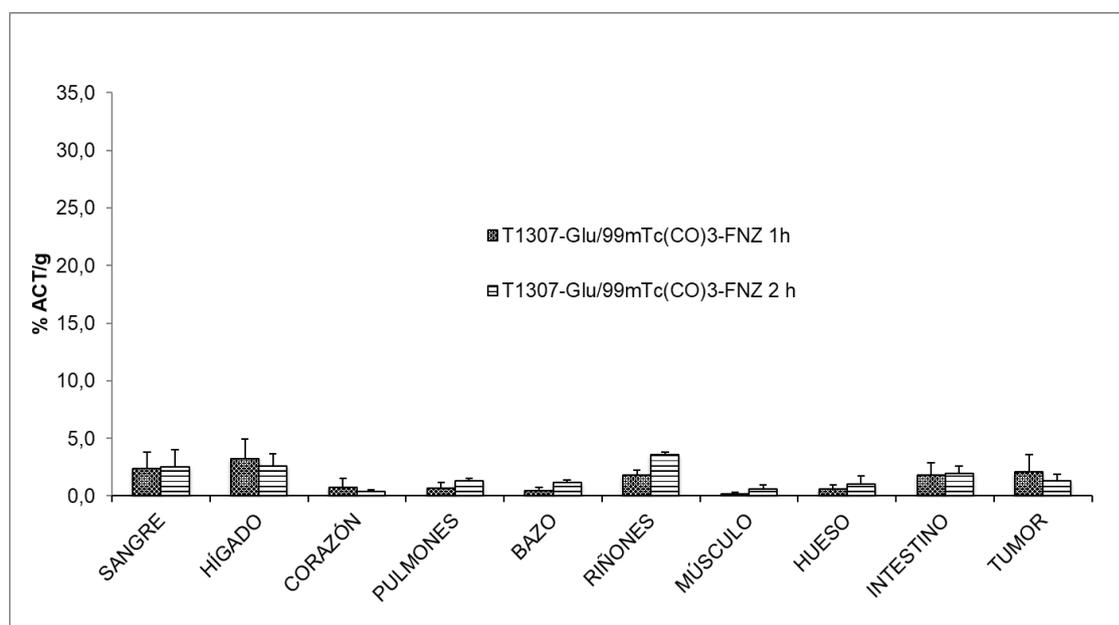


Figura 34. Biodistribución de T1307-Glu/^{99m}Tc(CO)₃-FNZ a 1 y 2 horas post inyección IV en ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1 (n=4).

Sistema	T/M	T/M
	1 hora	2 horas
$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$	1.33	0.87
T1307-Glu/ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$	10.5	0.81
T1307/ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$	1.3	1.06

Tabla 17. Relaciones de actividad por gramo tumor/músculo (T/M) para las formulaciones ensayadas $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$, T1307-Glu/ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ y T1307/ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$.

4.10. Marcación directa con ^{99m}Tc de la poloxamina T1307®

Para conocer la biodistribución del nanovehículo es que se exploró el marcado directo ^{99m}Tc . Se procedió a la marcación de T1307 ya que no se ha encontrado reporte anterior de marcación en este tipo de MPs y se muestran como promisorios materiales nanoestructurados para la encapsulación de FNZ.

El radiomarcado de T1307 con ^{99m}Tc se realizó con éxito en poco tiempo (40 minutos), buen rendimiento y con pureza radioquímica del ^{99m}Tc -T1307 mayores del 90 % medido a través de controles cromatograficos en capa fina y HPLC (imagen del perfil no mostrada).

4.11. Estudio de ^{99m}Tc -T1307 en BALB/c con un tumor 4T1 inducido

Se inyectó ^{99m}Tc -T1307 en BALB/c con un tumor 4T1 inducido, y fue posible observar las acumulaciones máximas de radiactividad a las 2 horas después de la inyección en hígado, riñones, estómago y tumor (ver **Figura 34**). Se observan diferencias significativas en la captación del hígado en la primera hora comparado con las 2, 4 y 24 horas. Lo mismo pasa con la captación por riñones y estómago.

La radiactividad en el tumor se mantuvo casi constante entre 2 y 4 horas con una ligera disminución a las 24 horas. Los datos indicaron que la captación del

radiomarcado en dichos órganos se pudieron observar hasta 24 horas después de la inyección (ver **Figura 35**).

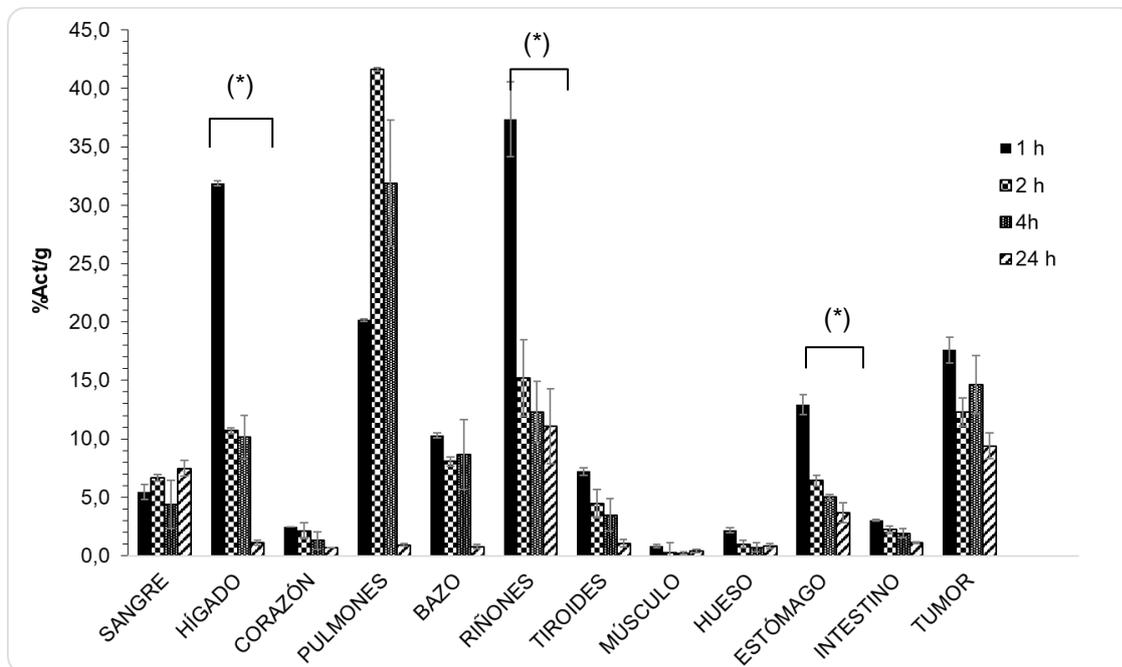


Figura 35. Biodistribución de ^{99m}Tc -T1307 a 1, 2, 4 y 24 horas post inyección en BALB/c con tumor de mama inducido 4T1 (n=4). *Las diferencias entre los parámetros evaluados son estadísticamente significativas si el p valor es menor a 0.05.

5. Discusión

El desarrollo de nanotransportadores para transportar fármacos a tumores invasivos es una de las áreas de mayor desarrollo, siendo el efecto EPR el mecanismo pasivo más descrito para la acumulación de nanomateriales en tumores (liposomas, dendrímeros, quantum dots, entre otros) (27-29,157,160,161). En este sentido, se ha trabajado exhaustivamente en el desarrollo de estrategias nanotecnológicas para superar obstáculos de solubilidad, de un candidato a fármaco poco soluble FNZ, con el objetivo de alcanzar y aumentar su biodisponibilidad en los tumores hipóxicos en preferencia a los tejidos normales (79, 81, 83).

Los MPs y mezclas de MPs son nanoestructuras que presentan una arquitectura de núcleo/corona compuesta por bloque anfifílicos con propiedades útiles para el suministro de FNZ con el fin de reducir la biodisponibilidad en tejidos normales, y mejorar su solubilidad en el medio biológico (208 µg/mL) (ver **Tabla 10**).

Tanto las MPs libres, como conteniendo FNZ, se obtuvieron de manera controlada, reproducible y escalable, presentando CMCs adecuadas para el desarrollo de esferas nanoestructuradas de tamaños y potenciales Zeta adecuados (ver **Tabla 7**), evidenciados por distintas técnicas complementarias como DLS, TEM y por AFM (42).

La encapsulación de FNZ en MPs de T1307, F127 y mezclas T1307:F127 (50:50) prístinas y glucosiladas (T1307-Glu y F127-Glu) al 15 % p/v en medios acuosos arrojaron como resultado, en todos los casos, una superación de su escasa solubilidad y biodisponibilidad (ver **Figura 10**). Lo mismo sucedió con las mezclas de MPs con LPS, que se evaluaron como una mezcla con características únicas. En este caso en particular, se ha podido explorar y profundizar, la encapsulación de FNZ, en una de estas mezclas: F127 (10 % p/v) con LPS, teniendo en cuenta el pobre comportamiento de las MPs a base de F127 prístino (ver **Tabla 8, 9 y 10**).

Específicamente, en referencia, al análisis de las formulaciones micelares nanoestructuradas desarrolladas con FNZ, es de destacar que revelaron una solubilización de más de 10 veces con respecto al fármaco libre (ver **Tabla 10**), y

estabilizaron el encapsulamiento del principio activo (determinado por DLS) por más de 24 horas (ver **Tabla 8 y 9**). Lo mismo sucedió con las mezclas de MPs con LPS, particularmente se profundizó en el estudio de mezclas de F127 con LPS, que reveló una máxima capacidad de encapsulación del fármaco, y estabilización por más de 24 horas, lo que le otorga una buena performance a las MPs prístinas (ver **Tabla 10**).

En particular, el potencial Zeta de las mezclas de MPs con LPS fue más negativo que las MPs en solución acuosa, lo que indica que el agregado de LPS estabiliza la corona micelar, confiere una mayor estabilidad fisicoquímica y disminuiría la tendencia a la autoagregación de MPs, por al menos 24 horas (ver **Tabla 8 y 9**). Es importante destacar que las MPs prístinas y glucosiladas presentaron potenciales Zeta próximos a la neutralidad o levemente negativo, característico de este tipo de MPs. Tal resultado no parecería evitar una potencial traslación a la clínica dado que ya existe una formulación de similares características como la SP-1049C, compuesto conformado por poloxámeros F127:L61.

Por otro lado, la incorporación de LPS pudo mejorar la carga, la estabilidad y disminuir la agregación de complejos de MPs cargados con FNZ (ver **Tabla 9**).

El tamaño promedio de todas las MPs aumentó después de la encapsulación de FNZ y en la mayoría de los casos a 37°C se logra una mayor estabilización de los sistemas preparados.

Los tamaños de las formulaciones de MPs cargadas con FNZ fueron de 39 a 897 nm por DLS, con tamaños comparables por TEM y AFM (ver **Tabla 8 y 9 y Figura 21 y 22**). Las MPs preparadas resultaron económicas (uso de pocas cantidades, bajo costo de producción (500 dólares el kilogramo de alta pureza sigma®)), escalables y con potencial aplicación para la solubilización y estabilización de fármacos de naturaleza poco soluble, como FNZ. Por otro lado, es de destacar que todas las MPs prístinas se encuentran aprobadas por la FDA, lo que facilitaría los pasos a seguir para una futura aplicación clínica (**163**).

También se ha comprobado que la liberación del fármaco, desde las nanoestructuras, presentó una liberación controlada y prolongada durante la fase de

liberación lenta (ver **Figura 23 A-F**). Probablemente, ello sea debido a que estos nanosistemas exhiben una mayor área superficial para la liberación (**131, 134, 135, 157**). La liberación en la primera hora, aumentó del 2.46 al 8.2 %, dependiendo del copolímero, lo que indicó una unión de la FNZ. Luego se observó una liberación lenta por al menos 24 horas, liberándose el 100 % del fármaco a las 48 horas, en el caso de F127 LPS, T1307:F127 y F127-Glu, no siendo así para T1307 y T1307-Glu. Esta liberación lenta puede deberse a la inclusión del complejo de FNZ en las MPs y mezclas de MPs. Así como por su estructura de reticulación de las MPs/mezclas de MPs; esto confirma una óptima complejación entre FNZ y MPs/mezclas de MPs (**157, 134, 135**). En la mayoría de los casos, excepto para F127-Glu, se observó que la mejor correlación se obtiene para un ajuste de Higuchi. Asimismo al calcular el factor "n", en base a la correlación de Peppas, se pudo observar una liberación bifásica, con una liberación inicial rápida, liberándose menos del 10 % en los primeros 45 minutos, seguida de una liberación lenta (ver **Figura 24 A-D**). Dicha liberación lenta (en 48-72 horas) genera un aumento de circulación en plasma y otorga una mayor probabilidad de captación tumoral de las diferentes nanoformulaciones. Asimismo, dicho aumento en circulación impactaría en reducción de las frecuencias de dosis y los hacen adecuados para su potencial aplicación como agente imagenológico/terapéutico.

Asimismo, se puede decir que la encapsulación de FNZ en las MPs, otorgó mejoras en la toxicidad *per se* del fármaco. Para evaluar este aspecto, se utilizó *in vivo* el análisis recomendado por la OECD conocido como test "-Up and Down-". Este resultado es sumamente interesante ya que se redujo la irritación de los tejidos que se genera generalmente con este tipo de fármacos poco solubles cuando se emplea la vía parenteral (en este caso IP) (**102, 104, 130, 146**). La toxicidad aguda mostró MDT superiores a 2000 mg/kg de masa corporal de ratón para todas las MPs y mezclas de MPs con LPS. Lo que demuestra e induce a discernir que hubo una mejora importante en la toxicidad con respecto a la FNZ libre, en la cual se obtuvo una MDT de 1500 mg/kg de masa corporal del ratón. Los animales solamente presentaron piloerección en algunos de los casos, en los primeros tiempos, siendo el único signo evidenciado a partir de la realización del test de Irwin. Dicho resultado se

podría deber a una protección de la FNZ por parte de las MPs ensayadas (ver **Tabla 13**).

De igual forma, se pudo evidenciar en estudios *in vitro* de mutagenicidad, según el *Test de Ames* recomendado por la OECD, que, si bien la mutagenicidad no desapareció, fue posible modificarse, mejorándose positivamente. El potencial mutagénico de FNZ se modificó tras el encapsulado. Algo sumamente interesante es que se desarrolló una formulación la cual no denotó mutagenicidad frente a una de las cepas de *S. typhimurium* (TA 100) como lo fue F127-Glu (ver **Tabla 12 y Figura 25**), dado posiblemente por la protección del fármaco o por la liberación prolongada de dicha formulación.

La administración IP de este tipo de MPs proporcionó una vía de inoculación rápida que mejora la biodisponibilidad de la FNZ. Posiblemente, la ventana de absorción de dicho fármaco se ha podido aumentar, debido al tamaño en el orden nanométrico de las partículas administradas y a las características de este tipo de nanoestructuras (**24, 25, 157**).

En cuanto a los tratamientos *in vivo*, en ratones BALB/c portadores de tumor de mama 4T1, se evidenció que hubo una potenciación de la actividad biológica en el caso de las MPs glucosiladas, ya que se observó una caída del crecimiento tumoral con respecto al control generándose una inhibición de 54 % para F127-Glu/FNZ y del 21 % para T1307:F127/FNZ, al final del experimento, a una concentración de 200 mg/kg de FNZ (ver **Figura 27**). Similarmente, para el tratamiento de 20 mg/kg donde se obtuvo una inhibición del 23.6 % para F127-Glu/FNZ y del 45.8 % para T1307-Glu/FNZ, al final del tratamiento (ver **Figuras 26, 27, 28 y 29**).

Esto puede deberse posiblemente a dos factores: 1- efecto EPR (**21, 34, 35**) que depende de la naturaleza permeable de la vasculatura del tumor y la circulación prolongada que permite la acumulación en el tejido tumoral, 2- reconocimiento de los residuos glucosa (en el caso de las formulaciones con Glu) por los receptores GLUT que están sobreexpresados a nivel tumoral y 3- sobreexpresión de enzimas reductasas (característica de microambientes hipóxicos) que biorreducen a la FNZ. Esta sobreexpresión se reporta ampliamente en la literatura (**36-39, 155, 156**) y

puede ser responsable del aumento del porcentaje de inhibición tumoral producido por estos sistemas conjugados a Glu. Dichos resultados resultan muy interesantes si se tiene en cuenta las descripciones para fármacos poco solubles, lo que además alienta en el trabajo futuro con MPs y MPs modificadas (**163, 164**).

Asimismo, se ha reportado que en dicho modelo tumoral esta sobreexpresado el factor inducible por hipoxia (HIF-1) es uno de los principales reguladores en las vías sensibles a la hipoxia (**165**) por lo que la llegada de la FNZ al microambiente tumoral podría estar ocasionando una depresión del crecimiento tumoral y la metástasis. Una disminución en el grado de invasión se vió evidenciado por menores masas de órganos como el bazo postratamiento con las diversas nanoformulaciones en relación a los controles de ratones con tumor sin tratar. Denotándose disminuciones, en algunos casos, que se acercan a la masa del bazo normal. Igualmente consideramos que se podrían hacer estudios adicionales para cuantificar dichas metástasis, que nos otorgarían más herramientas para afirmar nuestras observaciones.

Los análisis clínicos de sangre (bioquímicos y hematológicos) post tratamiento con las nanoformulaciones con 20 mg/kg de FNZ, revelaron que no hay cambios de los niveles normales de alaninoamino transferasa (GPT) y aspartato aminotransferasa (GOT) que están en el interior de las células del hígado (hepatocitos), entre otros, y que desempeñan un papel importante en el metabolismo y que pueden verse alterados en cáncer de mama metastásico, como así lo demuestran los valores para los animales sin tratamiento (ver **Tabla 15 y 16**) (**166**). Estos valores, que se normalizan en los animales tratados, están en concordancia con la evolución de los tamaños tumorales, mostrando una potencial mejoría de los animales con el tratamiento quimioterápico (ver **Figura 29 y 30**).

Asimismo, cabe destacar que los restantes valores bioquímicos, post tratamiento con las nanoformulaciones, son revertidos, en la mayoría de los casos, desde los valores anormales ocasionados por el propio tumor. Nuevamente, se puede decir que existe una potencial acción farmacológica de FNZ, protección que le otorga ventaja frente a posologías de fármaco libre (ver **Tabla 14 y 15**). Siendo así que se

considera que el fármaco estaría ejerciendo su acción selectivamente en el modelo tumoral (157).

Los nanosistemas de $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ encapsulado se obtuvieron de manera eficiente, pero el más promisorio fue T1307-Glu de los dos que se ensayaron (ver **Figura 31 y Tabla 16**).

Los estudios *in vivo* con $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ con MPs a base de Tetronic T1307 prístinos y funcionalizados con gluconolactona, revelaron un mayor tiempo de circulación en modelos de ratones con tumor 4T1 para el cáncer de mama (si se compara con la biodistribución del $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ (ver **Figura 33 y 34**).

Algo interesante en las biodistribuciones de $\text{MPs-}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$, es que no se observa una preferencia por el hígado en ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1 (ver **Figura 32**), lo cual es un resultado muy alentador, teniendo en cuenta que la mayoría de las nanopartículas denotan una clara eliminación hepática (163). Asimismo, se vió un mejor comportamiento para T1307-Glu, donde los porcentajes de actividad por gramo están por debajo del 5 % a 1 y 2 h (ver **Figura 34**).

En este sentido, se ha mejorado la rápida eliminación del sistema circulatorio de FNZ, ya que se evidenció presencia dos horas después de su administración IV, acumulándose a nivel tumoral, que se ve evidenciado por una relación tumor/músculo de 10 veces a la hora post inyección (3, 26) (ver **Tabla 17**).

Asímismo existió una clara captación a nivel renal de la MP glucosilada T1307 (T1307-Glu) (ver **Figura 34**) que podría estar asociado a su mayor hidrofiliidad (166, 167). Es de destacar que no hay antecedentes descritos en este tipo de MP, por lo que sería muy interesante seguir explorando este derivado en otros modelos tumorales para conocer los patrones de biodistribución empleando radiomarcación con ^{99m}Tc (ver **Figura 35**).

6. Conclusiones

Se desarrollaron MPs y mezclas de MPs con LPS, con una buena eficiencia de encapsulación, reflejada en una mejora en la solubilidad y estabilidad de FNZ. Las MPs desplegaron adecuados tamaños hidrodinámicos, distribución de tamaños y potenciales Zeta, indicativos en todos los casos de estructuras estables para el aprovechamiento del efecto EPR. La encapsulación y otorgamiento de estabilidad de FNZ en MPs y mezclas de MPs con LPS aumentó significativamente la actividad antitumoral *in vivo* en un modelo de cáncer de mama metastásico simil fase IV humano.

Además, la glucosilación de MPs, tanto de poloxámeros como poloxaminas, reveló una acentuada mejora en la captación tumoral de las MPs *in vivo* ya que se evidenció un mayor porcentaje de inhibición del tamaño tumoral de dichos nanotransportadores con FNZ.

El complejo $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ se formó con éxito, con una pureza radiofarmacéutica del 95.4 %. Asimismo, todos los nanosistemas encapsulados $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-FNZ}$ se obtuvieron de manera eficiente, mostrándose promisorio el uso de los derivados glucosilados T1307-Glu, con el fin de aprovechar el "*targeting*" activo, y la evidencia de mejoras en las relaciones tumor músculo por al menos 1 hora.

Por lo anteriormente mencionado, se concluye que los nanosistemas desarrollados en la presente tesis resultan potenciales agentes para su aplicación con fines terapéuticos, para el tratamiento en estadios avanzados del cáncer de mama en condiciones de hipoxia.

7. Agradecimiento a programas de financiamiento

El trabajo fue apoyado prácticamente en su totalidad por ANII (por la beca doctoral, estancia de investigación y el financiamiento a través del proyecto). Asimismo, fue parcialmente apoyado por: PEDECIBA (reactivos para el proyecto), CONICET (para proporcionar apoyo financiero parcial), CSIC (estancias de investigación), CAP (beca de finalización de doctorado), AUGM (programa de movilidad docente por

actividades de investigación y divulgación) y FFYB-UBA cátedra de Tecnología Farmacéutica.

8. Presentaciones en congresos del trabajo doctoral

7. 2018- Presentación en formato póster del trabajo titulado: "**In-vivo evaluation of ^{99m}Tc polymeric micelles probes loaded with 2-amino-7(8)-fluorophenazine N5, N10-dioxide as a potential target & delivery agent toward breast cancer tumors**" en la Reunión anual SAIC-SAI-SAFE-NANOMED 2018. **1er premio al mejor trabajo de investigación NANOMED-ar – SAIC-SAI-SAFE**, Mar del Plata, Argentina. Noviembre del 2018.
6. 2018- Presentación oral del trabajo titulado: "**In vitro and In vivo evaluation of 2-amino-7(8)-fluoroph enazine N5,N10-dioxide within polymeric micelles as theranostic agents**". TechConnectWorldInnovationConference& Expo. Anaheim Convention Center, Anaheim, California, EEUU. Mayo 2018.
5. 2017- Presentación en formato oral del trabajo titulado: "**^{99m}Tc-Tricarbonyl- (2-amino- 5,10-dioxide- 7(8)-fluorophenazine) as Probe for Mammary Hypoxic-tumors Imaging**" en el 3rd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry. Noviembre 2017.
4. 2017- Presentación en formato poster del trabajo titulado: "**2-Amino-7(8)-fluorophenazine N5,N10-dioxide: Scale-up and toxicity Evaluation**" en el 3rd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry. Noviembre 2017.
3. 2017- 161° Jornada Científica. Presentación en formarto póster del trabajo titulado: "**NANOSISTEMAS DE FENAZINA COMO POTENCIALES AGENTES SELECTIVOS EN CONDICIONES DE HIPOXIA PARA EL TRATAMIENTO DELCÁNCER DE MAMA**" en la 161° Jornada Científica organizada por la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires, Argentina. Agosto de 2017.
1. 2016- Presentación en formato póster del trabajo titulado: "**Novel anticancer fluorophenazine within polymeric nanomicelles: Synthesis, physicochemical**

characterization and in vitro evaluation of the antitumor effectiveness” en la Reunión anual NANOMED-ar – SAIC-SAI–SAFE, Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2016.

9. Artículos científicos publicados, en revisión o en preparación del trabajo doctoral

4. Nicole Lecot, Carina Sánchez, Belén Dávila, Marcelo Fernández-Lomónaco, Hugo Cerecetto, Pablo Cabral, Romina Glisoni, Mercedes Gonzalez. “Improved antitumoral effects of phenazine-5,10-dioxides loaded in PEO-PPO pristine and derivatized micelles”, en preparación 2020.

3. Nicole Lecot, Romina Glisoni, Natalia Oddone, Juan Benech, Marcelo Fernández-Lomanaco, Juan Pablo Gambini, Pablo Cabral and Alejandro Sosnik. “Glucosylated Polymeric Micelles Actively Target Curcumin to a Breast Cancer Model”, *Advanced Therapeutics*, mayo 2020. DOI: 10.1002/adtp.202000010.

2. Nicole Lecot, Gonzalo Rodríguez, Valentina Stancov, Mercedes González, Romina Glisoni, Pablo Cabral, Hugo Cerecetto. “Development of fluorescent- and radio-traceable T1307-polymeric micelles and studies of biodistribution on tumor-bearing mice”, *Journal of Brazilian Pharmaceutical Sciences*. Agosto 2019 (aceptado, febrero 2020, autor de correspondencia).

1. Belén Dávila, Carina Sánchez, Marcelo Fernández, Hugo Cerecetto, Nicole Lecot, Pablo Cabral, Romina Glisoni, Mercedes González. “Selective hypoxia-cytotoxin 7-fluoro-2-aminophenazine 5,10-dioxide: toward “candidate-to-drug” stage in the drug-development pipeline”, *ChemistrySelect*. 2019; 4(32): 9396-9402. DOI:10.1002/slct.201902601 (autor de correspondencia).

10. Perspectivas futuras

Se están llevando a cabo estudios adicionales sobre la encapsulación de FNZ en nuevos derivados de MPs funcionalizados con folato para apoyar la utilidad de estos nanosistemas con enfoque diagnóstico, aprovechando la sobreexpresión de receptores de folato en tumores de mama, tal como se describe en la bibliografía. Este tipo de desarrollo permitiría estudiar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas en oncología, que se podrían explorar así mismo en otros tipos de cáncer.

Además, se podría profundizar en nuevas formas de vehiculización que impactarían en la mejora de la solubilidad, no solo de FNZ sino de otros derivados *N*-óxido, con interesantes acciones farmacológicas. Lo cual implicaran nuevos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

11. Anexos

Solubilidad de FNZ en agua

La FNZ resultó tener una solubilidad en H₂O de 208 µg/mL a 25°C, calculada a partir de la interpolación en la curva realizada (ver **Figura 34**) promedio de una repetición de 4 veces con un R² de 0.9911 y una ecuación de la recta con $y = 0.0775x + 0.0246$.

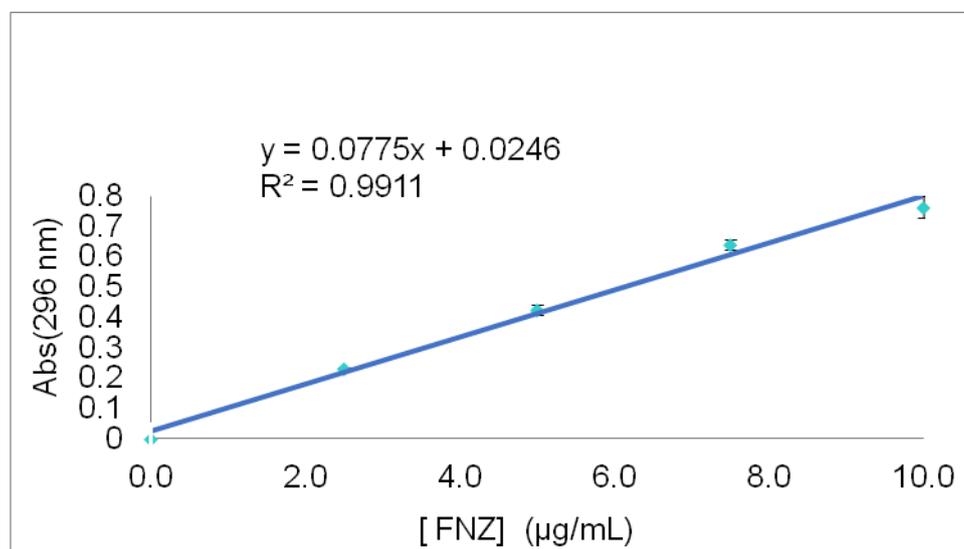


Figura 36. Curva de calibración de FNZ en DMSO por espectrofotometría UV-VIS (n=3), para posteriores análisis de eficiencia de encapsulación y análisis de liberación de las diferentes MPs y mezclas de MPs ensayadas encapsulando FNZ a temperatura ambiente.

Test de AMES

Preparación de medio mínimo selectivo para revertientes HIS⁺

Se disuelven las cuatro sales primeras en agua milli-Q (ver **Tabla 19**) y el Bacto agar (por otro lado) se disuelve en agua milli-Q. Ambas disoluciones autoclavan a

una temperatura de 121°C durante 20 minutos. Ya autoclavados, se coloca el matraz con agar a 57°C y la disolución de sales se deja enfriar a temperatura ambiente.

Sustancia	Masa (g)	Volumen(L)
K₂HPO₄	7.0	
KH₂PO₄	2.0	
(NH₄)₂SO₄	1.0	
C₆H₅O₇Na₃·2H₂O	0.25	
Bactor agar	15.0	
H₂O		1

Tabla 18. Relaciones en masa y volumen de cada uno de los componentes de medio mínimo selectivo para revertientes HIS⁺.

Luego se añaden ambas en flujo y se agregan 10 mL de las siguientes disoluciones estériles y se agita vigorosamente:

- ✓ MgSO₄·7H₂O (0.04 M)
- ✓ D(+)-Glucosa (1.1 M) (filtrado con filtro 0.22 µm).

Colocar 20 mL por placa y dejar solidificar. Luego secar en la estufa a 37°C con la tapa hacia abajo (dejarlas mínimo 24 horas antes del experimento, a modo de corroborar que no hubo contaminación). No conservar dichas placas por más de un mes.

Preparación de medio de cultivo Oxoid N°2

Se utiliza en el ensayo de AMES para obtener los cultivos exponenciales (medio líquido) y para verificar el fenotipo de las estirpes (medio sólido) (ver **Tabla 20**).

Sustancia	Masa(g)	Volumen (L)
Medio de cultivo Oxoid N°2	25.0	
Bacto agar	15.0	
H ₂ O		1

Tabla 19. Relaciones en masa y volumen de cada uno de los componentes de medio mínimo selectivo para revertientes HIS⁺ para la preparación de un litro de medio.

Medio sólido: Autoclavar a una temperatura de 121°C durante 20 minutos, repartir 20 mL por placa, solidificar y secar en estufa a 37°C, con la placa hacia abajo, durante 24 horas.

Medio líquido: misma preparación que el medio sólido, pero NO se le agrega el agar. Luego de autoclavar dejar enfriar a temperatura ambiente y reservar en la heladera.

La conservación se realiza a T: 2-8°C. Estas disoluciones se preparan para su utilización inmediata, y tendrán una caducidad de 1 mes para las placas y de tres meses para el medio líquido.

Preparación del agar blando

Disolver los componentes (ver **Tabla 21**) con agua destilada y autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Dejar solidificar a temperatura ambiente.

Se conserva a temperatura de 2 a 8°C en el frasco de vidrio en el que ha sido esterilizado. Antes de utilizarlo, en caso de ser necesario, se funde en microondas en pulsos de 1 minuto hasta que está totalmente líquido.

Sustancia	Masa (g)	Volumen (L)
NaCl	0.5	-
Bacto agar	0.6	-
H ₂ O	-	0.1

Tabla 20. Relaciones en masa y volumen de cada uno de los componentes de agar blando para 0.1 L de medio completo.

Cuando se va a utilizar para el ensayo se agrega 10 mL de hisitidina/biotina de BAJA concentración, que se describe a continuación.

Preparación de las disoluciones de Histidina/Biotina

Las disoluciones de Histidina/Biotina sirven para suplementar el agar blando que se utiliza en el ensayo de AMES, contiene trazas de histidina. Se disuelve la L-Histidina y la D-Biotina en los 100 mL de agua milli-Q (ver **Tabla 22**). Esterilizar filtrando con filtro Millipore de 0.22 µm. Se conserva a temperatura de 2°C a 8°C no más de 3 meses.

Disolución 0.5 mM Hisitidina/ 0.5 mM Biotina		
Sustancia	Masa (mg)	Volumen(L)
L-Histidina monohydrochloride	10.48	-
D-Biotina	12.21mg	-
H ₂ O milli-Q	-	0.1

Tabla 21. Cálculo de masa y volumen de cada uno de los componentes de 0.5 mM Hisitidina/ 0.5 mM Biotina para 0.1 L total.

Preparación de la mezcla de S9

La preparación de la mezcla se realiza el mismo día que se vaya a realizar el ensayo de AMES hay que preparar el volumen que se haya previsto utilizar de mezcla S9 (ver **Tabla 23**).

Descongelar las disoluciones de NADP, G-6P y la fracción microsomal S9. Para ello se colocan sobre hielo picado hasta su descongelación. Añadir los volúmenes correspondientes a cada uno de los componentes de la mezcla a un tubo de ensayo estéril y mantenerlo siempre con hielo. Agitar bien la mezcla en vórtex.

Los restos de la fracción microsomal S9 y de la mezcla se desechan y se congelan las disoluciones de NADP y de G-6-P a -20°C.

Sustancia	Concentración (g/L)
Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADP)	3.5
D-Glucosa-6-fosfato(G-6-P)	1.6

Tabla 22. Relaciones en concentración de cada uno de los reactivos a emplear para la mezcla de S9.

Porcentaje de S9	Reactivos	Volúmenes finales (10 mL)
5% S9	NADP	0.4
	G-6-P	0.05
	Disolución salina	0.2
	Tampón fosfato	5.0
	S9	0.5
	H ₂ O	3.85
10% S9	NADP	0.4
	G-6-P	0.05
	Disolución salina	0.2
	Tampón fosfato	5
	S9	1
	H ₂ O	3.35
30% S9	NADP	0.4
	G-6-P	0.05
	Disolución salina	0.2
	Tampón fosfato	5
	S9	3
	H ₂ O	1.35

Tabla 23. Relaciones en masa y volumen de cada uno de los componentes de la mezcla S9. En negrita en la relación empleada en los ensayos de la presente tesis (no reportado, a completar).

El ensayo se realiza con y sin activación metabólica porque pueden haber compuestos que no son activos de por sí, sino que lo son una vez que son metabolizados a formas biológicamente activas. Esto también permite saber si los

efectos mutagénicos son dados por el compuesto en sí mismo o por productos de su metabolización.

En general se usa un porcentaje de S9 de 5 %, en caso de que se use más de ese porcentaje se debe realizarun control negativos para cada una de las concentraciones

Test de Irwin

A continuación, se adjunta la **Tabla 38** donde se reportan los parámetros estudiados para cada animal en el ensayo de *-Up and Down-*. A modo de que se puedan apreciar los parámetros analizados y el significaco de cada valor.

Los valores en su mayoría van de 0 a 8, y se le asignara el valor correspondiente según el comportamiento del animal al realizar el test, siendo el valor 0 como no respuesta frente al estímulo (según corresponda) y 8 cuando la respuesta es muy brusca y fuera de los parámetros normales para la especie (ver **Tabla 25**).

Ratón:					Sexo:					Tratamiento:					Registro Comportamental						
Tiempo:					Tiempo:					Tiempo:						Tiempo:					(*)
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Ubicación visual
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Actividad espontánea
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Reactividad
0	2	4	6		0	2	4	6		0	2	4	6		0	2	4	6		4	Respuesta al contacto
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Respuesta al dolor
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Respuesta al espanto
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Estereotípias
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Vocalización
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Pasividad
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Irritabilidad
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Temor
>10	< 10				>10	< 10				>10	< 10				>10	< 10				>10	Pasillo
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Posición corporal
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Fuerza de presa
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Tono corporal
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Tono de miembros

0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Reflejo auricular
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Reflejo corneal
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Reflejo ipsilateral
0	2	4			0	2	4			0	2	4			0	2	4			4	Equilibrio
0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	Reflejo de enderezamiento
5	6	7	8	9	5	6	7	8	9	5	6	7	8	9	5	6	7	8	9	0	
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Temblores
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Contracciones
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Convulsiones
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Marcha atáxica
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Marcha hipotónica
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Elevación pelviana
0				2	0				2	0				2	0				2	0	Cola de Straub
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Contorsiones
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Tamaño pupilar
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Abertura palpebral
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Color de la piel
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Frecuencia respiratoria
0				2	0				2	0				2	0				2	0	Exoftalmos
0	2	4			0	2	4			0	2	4			0	2	4			0	Micción
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	4	Salivación
0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	Piloerección
0				2	0				2	0				2	0				2	0	Diarrea
0				2	0				2	0				2	0				2	0	Hipotermia
Ratón:					Sexo:					Tratamiento:											
Fecha										Peso(g)											

Tabla 24. Tabla representativa de reporte de datos diarios (test de Irwin) para cada animal BALB/c.

A continuación, se explicará cada uno de los parámetros con su respectiva escala:

I. Observación del animal en la jaula en cuanto a actividad espontánea y posición corporal

En cuanto a la **actividad espontánea** se valora la rapidez y del vigor del movimiento del animal según una escala. En la cual se asigna como 0 si el animal no se mueve y un máximo de 8 si el movimiento es extremadamente vigoroso (movimientos muy bruscos).

Asimismo, se analiza la **posición corporal** en cuanto a la postura que el animal adopta en la jaula. Se valora como 0 cuando el animal está completamente extendido, echado; y un valor de 8 si el animal se posiciona sobre sus patas traseras, generando en algunos casos, saltos verticales de modo repetido.

II. Se toma al animal por la cola trasladándolo desde la jaula al centro del campo, donde se observan y valoran los parámetros de reactividad y estereotipias (o comportamientos extraños)

En cuanto a la **reactividad**, se observa el estado del animal durante y tras el traslado desde la jaula al campo, analizando la actitud del animal frente al nuevo entorno.

Se valora como 0 cuando el animal presenta estupor extremo (animal "embotado", excesivamente relajado; completamente inmóvil) y los movimientos de cabeza y/o cuerpo son casi inexistentes. Y el máximo de 8 cuando el animal se encuentra extremadamente intranquilo (movimientos muy marcados, muy bruscos y muy rápidos de cabeza y cuerpo).

Si la **reactividad** del animal es valorada como 0 ó 2, habrá que considerar la presencia de **catalepsia**; para ello se coge al animal de la cola y se sitúa sobre la rejilla. Existirá catalepsia cuando el animal permanezca en la posición en la que lo dejamos sin variar su posición. En caso de presentarse, se registrará el dato.

Las **estereotipias** se valoran según aparición de:

- a. Movimientos bruscos de la cabeza hacia atrás.
- b. Movimientos de la cabeza de lado a lado de modo repetitivo.
- c. Respuesta del animal a objetos inexistentes: "comportamiento alucinatorio"
- d. Mordiscos bruscos y repentinos a algún objeto, y generalmente a la rejilla.
- e. Mordiscos auto-destructivos: el animal se muerde así mismo, sobre todos los dedos de las patas traseras, provocándose heridas sangrantes.
- f. Lameduras constantes al suelo o a algún otro objeto del campo.
- g. Cambios continuos de posición, generalmente desde un miembro delantero al otro, con movimientos de cuerpo de lado a lado.
- h. El animal anda sobre sus miembros traseros.
- i. Tendencia del animal a moverse en círculo.
- j. Desorientación espacial: el animal se tropieza con los objetos.

**Nota: Estos y cualquier otro comportamiento extraño que se pueda presentar debe ser anotado.*

Se valorará la intensidad de aparición asignando como 0 a normalidad (sin comportamientos extraños) y un máximo de 8 a cuando aparecen uno o varios comportamientos extraños y es/son extremadamente intenso/s.

III. Se toma al animal por la cola transportándolo hasta el pasillo donde se analizará **longitud del pasillo** que recorre el animal, presencia de **cola de straub** y **elevacion pelviana**.

La **longitud del pasillo** se analiza colocando al animal en el extremo izquierdo de un pasillo, considerado punto de partida, y se mide la distancia recorrida por el animal en los primeros cuatro segundos tras el comienzo del movimiento hacia adelante. Sera valorado como > 10 (desplazamiento normal) y ≤ 10 cuando la alteración es moderada.

Además, se registran las posibles incidencias, tales como que el animal se salga del pasillo (mediante un salto) durante la marcha, o que el animal "husmee", "explore" la zona mientras la recorre.

La presencia de **cola de straub** se define cuando la cola del animal está formando 90° con su cuerpo y está rígida. Sera valorado como 0 cuando no existe y 2 cuando la presenta.

La **elevación pelviana** del abdomen, la cual se ve reflejada en la flexión-extensión de las patas traseras. Se valora como 0 cuando la elevación es normal, las patas traseras ligeramente flexionadas de modo que el abdomen no llegue a tocar el suelo. Y un máximo de 8 cuando el estiramiento de la pata trasera es importante y el abdomen del animal toca la superficie.

IV. Se coloca el animal, de nuevo, en el centro del campo para valorar los siguientes parámetros: **tipo de marcha, respuesta al espanto, temor, respuesta al contacto, pasividad, ubicacion visual, fuerza de presa, corneal, auricular e ipsilateral, así como la respuesta al dolor.**

El **tipo de marcha**, se clasifica como atáxica o hipotónica. La marcha atáxica se da cuando el animal oscila de lado a lado, "dando tumbos" es incapaz de andar en línea recta. Y la marcha hipotónica cuando el animal es incapaz de sostener su cuerpo, por lo que sus patas traseras están bastante abiertas e incluso, hay toques del abdomen con el suelo.

Se registrará la aparición de estas marchas anormales y, en cada caso, se valorará la intensidad con la que aparecen. Se otorgará el valor de 0 cuando no aparecen estos tipos de marcha; y 8 cuando es extremadamente marcada.

En cuanto a la **respuesta al espanto**, se valora la reacción del animal cuando chasqueamos los dedos o soplamos levemente a una pequeña distancia de la nariz del animal. Se asigna el valor 0 cuando no hay ninguna reacción por parte del animal y un máximo de 8 cuando la reacción es exagerada que puede ir incluso acompañada de movimiento hacia atrás del animal.

El **temor** consiste en valorar la reacción del animal cuando el observador extiende lentamente su dedo índice hacia la nariz del animal, dejándolo en esa posición durante, aproximadamente, cuatro segundos. Se asigna como 0 si el animal "explora" el dedo, lo husmea, olisquea repetidas veces y un máximo de 8 cuando no hay ninguna reacción por parte del animal.

La **respuesta al contacto** consiste en que el experimentador acaricia suavemente los costados y cuerpo del animal desde el abdomen hasta la cola, con los dedos índice y pulgar. Esta operación se realiza tres veces y se valora como 0 si el animal permanece indiferente y un máximo de 6 si el animal se retira de modo brusco, rápido y vigoroso, incluso cuando la caricia es sumamente débil

En cuanto a la **pasividad**, se valora el comportamiento y la reacción del animal cuando se le va colocando secuencialmente en distintas posiciones. Se interrumpe el proceso cuando se haya obtenido una respuesta activa por parte del animal.

La manera de realizarlo y valorarlo es la siguiente:

Sera valorado como 0 cuando se toma un pellizco de la piel entre las orejas. Si el animal se opone a ello, se remueve o escapa. La **pasividad** se valora como 8 (máxima) cuando el animal se opone a permanecer suspendido en posición invertida agarrado por una pata trasera.

Se observa la **ubicación visual** tomando al animal por la base de la cola y lo elevamos aproximadamente 15 cm. Desde esta posición se acerca lentamente en dirección de la rejilla, de modo que la velocidad de bajada disminuya conforme se acerque a la rejilla.

La valoración se realiza teniendo en cuenta la distancia entre la rejilla y la nariz del animal en el momento en el que el animal extiende sus patas delanteras hacia la rejilla.

Sera 0 cuando el animal no extiende las patas delanteras, incluso cuando su nariz ya ha tocado la rejilla. Y un máximo de 8 cuando la extensión de las patas delanteras muy pronto, a una distancia superior a los 4 cm.

En el análisis de la **fuerza de presa**, se coloca al animal sobre la rejilla y se le toma de la cola. Se tira de la cola del animal haciendo la fuerza necesaria para arrastrar al animal hacia atrás, valorando la oposición, la fuerza que opone el animal a ser arrastrado hacia atrás.

Se valora como 0 cuando el animal no opone resistencia y un máximo de 8 cuando el animal opone una resistencia poco frecuente, inusual, extremadamente grande, a dejarse arrastrar.

Se procede a la valoración de los reflejos **corneal, auricular e ipsilateral**, así como la **respuesta al dolor**.

Para ello, podemos tener al animal en el centro del campo, pero si el animal se mueve mucho, se coloca en la rejilla y se agarra por la cola, haciendo una ligera presión hacia arriba procediendo a la valoración de estos parámetros.

Para el **reflejo corneal**, se acerca la pinza de disección al ojo del animal y se valora el "guiño" o cierre del ojo. Se asigna el valor 0 cuando no cierra los ojos, un máximo de 8 si el animal hace un "triple guiño".

Se acerca la pinza de disección a la oreja del animal. Se valora la retirada de la oreja al acercar la pinza lo que se conoce como **reflejo auricular**. Se valora como 0 cuando el animal no retira la oreja. Y un máximo de 8 cuando la retirada muy brusca de la oreja, incluso a un ligero roce con las pinzas de disección.

Asimismo, el **reflejo ipsilateral** consiste en analizar la respuesta del animal cuando se pinza un dedo de la pata trasera del animal. Será valorado como 0 si el animal no responde y un máximo de 8 cuando hay reacción inusual del animal (retirada

hiperactiva, muy vigorosa, brusca y tendencia a morder la pinza de modo casi espontáneo).

La **respuesta al dolor** se valora como la respuesta del animal cuando se pinza la cola del animal, será 0 cuando el animal no responde y un máximo de 8 cuando hay reacción inusual del animal (retirada hiperactiva, muy vigorosa, brusca y tendencia a morder la pinza de modo casi espontáneo e incrementándose los gemidos).

Con el animal sobre la rejilla, se le toma la cola con la mano izquierda jalando un poco hacia arriba y se valora el **tono corporal**. Se toma al animal con los dedos índice y pulgar de la mano derecha se comprimen los costados del animal desde el tórax hasta la pelvis 3 o 4 veces a intervalos de un segundo aproximadamente. Los dedos del experimentador no deben ser retirados del cuerpo del animal durante todo el proceso. La escala de valores a asignar será de 2-8, y se valora la flaccidez-resistencia del animal.

V. Se sujeta la cola del animal con la mano derecha y con la mano izquierda se toma la piel del animal desde detrás de las orejas de modo que la cabeza quede inmovilizada.

Se gira la mano hasta colocar al animal en posición supina; en esta posición el cuerpo del animal descansará sobre la mano del observador. La cola del animal se coloca entre el dedo meñique y anular de la mano izquierda del observador.

Con el animal en esta posición se valora:

- ✓ **Tono de los miembros**
- ✓ **Frecuencia cardíaca**
- ✓ **Tamaño pupilar**
- ✓ **Salivación**
- ✓ **Color de la piel**

El **tono de los miembros** se analiza con la yema del dedo índice de la mano derecha presionando ligeramente la planta de las patas traseras del animal. Se

realiza la operación varias veces hasta que se determine la resistencia de las patas traseras del animal a la flexión pasiva. Se valora de modo subjetivo (siguiendo la escala 0-8) la resistencia de los miembros traseros.

La **frecuencia cardíaca** se valorará colocando la yema del dedo índice en la región torácica del animal hasta notar el pulso cardíaco. Teniendo en cuenta que la frecuencia normal puede oscilar entre 300-400 pulsaciones/minuto, se valora subjetivamente con la escala 0-8, el pulso cardíaco notado.

El **tamaño pupilar** se analiza observando el ojo del animal y se determina el diámetro pupilar, cuando el animal está en posición supina.

Si la pupila no pudiera ser observada porque el animal tiene los ojos cerrados, se forzará la apertura del ojo del siguiente modo: se coloca el dedo índice de la mano derecha en la cabeza del animal, presionando ligeramente hacia abajo mientras que con el dedo pulgar de la misma mano se realizará una suave presión debajo del ojo. La valoración se hace en función de la superficie del globo ocupada por la pupila, siendo 0 cuando la pupila presenta un tamaño de una "cabeza de alfiler" y un máximo de 8 cuando el globo ocular totalmente ocupado por la pupila.

En cuanto a la **salivación**, se observa si el área submaxilar está húmeda. Se valorará este parámetro en función del área que esté húmeda, siendo 0 cuando está totalmente seco, y un máximo de 8, si la totalidad del área submaxilar está húmeda.

En cuanto al **color de la piel**, se valoran las graduaciones de color de la piel del animal observando sobre todo el color del abdomen y en los dedos de las patas delanteras. Será 0 cuando el color es extremadamente blanco y un máximo de 8, si el color es casi rojo.

Se anota la presencia de **cianosis** en caso de que aparezca. Si existe color azulado de la piel, se valora la intensidad del color azul con una escala 0-8 independientemente de la anterior.

VI. Se coloca de nuevo el animal en el centro del campo. Desde aquí se toma el animal por la cola y se le acerca a la barra de equilibrio, permitiéndole que con sus

patas delanteras se agarre a la barra, quedando suspendido verticalmente. En esta posición se suelta la cola del animal y se observa su reacción.

Se valorará **equilibrio** siendo 0 cuando el animal es incapaz de colocar sus patas traseras en la barra de equilibrio (permanece suspendido de la barra o incluso puede llegar a caerse). Y máximo 4 cuando el animal coloca sus patas traseras rápidamente sobre la barra de equilibrio.

No se dará como válida la prueba si el animal sube a la barra de equilibrio apoyando primero la cola. El animal debe subir teniendo como único punto de apoyo sus patas delanteras.

VII. Se toma el animal por la cola y se lanza al aire, hacia arriba, de modo que el animal dé 2 ó 3 volteretas en el aire. Las posturas que el animal adopte al caer permiten valorar el **reflejo de enderezamiento**.

El animal se tira al aire 5 veces para determinar este parámetro. Se otorgará el valor 0 cuando el animal cae sobre sus cuatro patas y un máximo de 9 si el animal cae de espaldas y no hay intento de enderezamiento.

Durante todo el proceso, se irán observando y valorando otros parámetros indicativos del estado comportamental, neurológico y autonómico del animal:

La **vocalización** se valora según la escala general 0-8 (nada-extremo, respectivamente) de la frecuencia e intensidad con la que el animal chilló o gritó durante todo el proceso.

La **irritabilidad** se analiza subjetivamente según la escala 0-8, los intentos del animal por arañar o morder al investigador. Se manifiesta, sobre todo, cuando el animal es tomado por el investigador para medir los tonos y durante la medida de la pasividad.

Los **temblores** se caracterizan por movimientos oscilatorios del animal resultado de la contracción involuntaria de algunos músculos. Se puede manifestar en cualquier momento del test. Se valora la intensidad y frecuencia siguiendo la escala general 0 cuando no hay temblores y un máximo de 8 cuando son extremadamente fuertes.

Las **contracciones** son espasmos y movimientos del cuerpo del animal que pueden presentarse de modo muy variado:

A) Convulsiones clónicas: movimientos sincrónicos y alternativos de contracción-relajación de un grupo de músculos voluntarios.

B) Convulsiones técnicas: contracción persistente y sostenida de un grupo de músculos. Va acompañada de rigidez de articulaciones.

C) Convulsiones mioclónicas: sacudidas bruscas del cuerpo del animal que afectan a uno o varios músculos. No van acompañadas de inmovilidad de articulaciones.

D) Otros tipos:

-animal se posiciona sobre sus patas traseras cuando lo agarramos.

-el animal está echado sobre su espalda y gira haciendo intentos por levantarse.

-animal sentado sobre sus patas traseras teniendo sus manos delanteras juntas o cruzadas.

Para cada animal se anota el tipo de convulsiones de que se trata. Se valora según la escala 0-8 según la intensidad y frecuencia de las convulsiones.

Las **contorsiones** se manifiestan por movimientos de estiramiento de las patas posteriores y de torsión de la musculatura dorso-abdominal. Se valora de acuerdo a la intensidad y frecuencia de las contorsiones, siendo 0 cuando no aparecen contorsiones; y un máximo de 8 cuando son extremadamente intensas y/o frecuentes.

La **apertura palpebral** se analiza según la posición del párpado superior que determina la apertura- cierre del ojo. Puede observarse durante todo el proceso, pero sobre todo el paso del animal desde la jaula al campo. Se valora como 0 cuando los ojos están muy abiertos y un máximo de 8 cuando los ojos están totalmente cerrados.

Los **exoftalmos** aparecen cuando los ojos del animal aparecen hinchados. Es una anomalía caracterizada por "ojos saltones", protuberantes. Se observa su

presencia durante todo el test, pero la aparición de exoftalmos es detectable desde la primera observación del animal en la jaula. Se registra el dato como 0 cuando no existe exoftalmos y 2 cuando se detecta exoftalmos.

Se observa aparición de heces blandas, inconsistentes y líquidas, lo que se conoce como **diarrea**. Si no se detecta, se valora como 0; si se detecta diarrea, se anota como 2. No se valora ni intensidad ni frecuencia.

La **hipotermia** se evidencia cuando hay disminución de la temperatura corporal, se puede detectar durante las fases del test en las que el animal es palpado o tomado por el observador. Si se detecta hipotermia se anota su aparición (valor numérico 2) o 0 si no existe.

La **micción** se valora subjetivamente, será 0 si el volumen es normal y 4 si hay poliuria.

En cuanto a la **piloerección** del pelo del animal, esta se caracteriza porque la rata o el ratón presenta un aspecto de "borla", se posiciona más acusado, cuanto mayor es la intensidad de la piloerección. Se valora según la escala general 0-8 (0 cuando no existe y máximo 8 cuando es muy intensa).

La **frecuencia respiratoria** se analiza y observa, cuando el animal permanece en el centro del campo. Para ello hay que tener en cuenta que la frecuencia respiratoria normal puede oscilar entre 60 y 200 veces por minuto. Es así, que el investigador valora subjetivamente la frecuencia respiratoria (hay que tener en cuenta la actividad del animal), la cual será 0 si el animal no respira y un máximo de 8 cuando es extremadamente elevada.

12. Bibliografía

- 1- Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, Longacre M. Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *Int J Mol Sci*. 2013. 14(10): 21087–21113. DOI:10.3390/ijms141021087.
- 2- <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Consultado: 10.08.2019.
- 3- Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach. The Development and Causes of Cancer*. 2000. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates;. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>.
- 4- Nall R. What to know about cancer. MNT home. 2018. Disponible en: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/323648.php>.
- 5- Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2012. *Ann Oncol*. 23(4): 1044-1052.
- 6- <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data>. Consultado: 10.08.2019.
- 7- <https://www.cancer.gov/types/common-cancers>. Consultado: 10.08.2019.
- 8- <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Consultado: 10.08.2019.
- 9- Liu Y *et al*. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quant Imaging Med Surg*. 2015; 5(5): 708-729. DOI:10.3978/j.issn.2223-4292.2015.06.01.
- 10- Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan, AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol. Res*. 2017. 50(1): 33. DOI:10.1186/s40659-017-0140-9.
- 11- Anand S, Yasinchak A, Bullock T, Govande M, Maytin EV. A non-toxic approach for treatment of breast cancer and its metastases: capecitabine enhanced photodynamic therapy in a murine breast tumor model. *J Cancer Metastasis Treat*. 2019; 5:6. DOI:10.20517/2394-4722.2018.98.
- 12- Rainone P, Riva B, Belloli S, et al. Development of ^{99m}Tc-radiolabeled nanosilica for targeted detection of HER2-positive breast cancer. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12:3447–3461. DOI:10.2147/IJN.S129720.

- 13- <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>. Consultado: 10.08.2019.
- 14- Maughan KL, Lutterbie MA, Ham P. Treatment of Breast Cancer. *Am Fam Physician*. 2010; 81(11):1341-1346.
- 15- Coughlin SS, Cypel Y. Epidemiology of breast cancer in women. En: Ahmad A, (Editor). *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress*. New York: Springer Publishing. 2013. Pág. 19–34.
- 16- Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(8):591-602.
- 17- Neuman H, Morrogh M, Gonen M. Stage IV breast cancer in the Era of targeted therapy, Does surgery of the primary tumor matter. *Cancer*. 2015; 116(5):1226–1233.
- 18- <https://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/staging>. Consultado: 10.08.2019.
- 19- <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/treatment-of-breast-cancer-by-stage.html>. Consultado: 10.08.2019.
- 20- Farokhzad OC, Langer R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*. 2009; 3(1):16-20.
- 21- Cuenca AG, Jiang H, Hochwald SN, Delano M, Cance WG, Grobmyer SR. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer*. 2006; 107(3):459-466.
- 22- Webster TJ. Nanomedicine: what's in a definition? *Int J Nanomedicine*. 2006;1(2):115-116.
- 23- Ventola CL. The nanomedicine revolution: part 2: current and future clinical applications. *PT*. 2012; 37(10):582-591.
- 24- Nakanishi T, Fukushima S, Okamoto K, Suzuki M, Matsumura Y, Yokoyama M, et al. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *J Control Release*. 2001; 74(1-3):295-302.
- 25- Alvarez-Lorenzo C, Sosnik A, Concheiro A. PEO-PPO block copolymers for passive micellar targeting and overcoming multidrug resistance in cancer therapy. *Curr Drug Targets*. 2011; 12(8):1112-1130.

- 26- Navya PN, Kaphle A, Srinivas SP, Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials. *Nano Convergence*. 2019; 6(23): 1-30. DOI:10.1186/s40580-019-0193-2.
- 27- Maeda H., Greish K., Fang J. The EPR Effect and Polymeric Drugs: A Paradigm Shift for Cancer Chemotherapy in the 21st Century. En: Satchi-Fainaro R., Duncan R. (Editores). *Polymer Therapeutics II. Advances in Polymer Science*. 2005; 193(1):103-121. DOI:10.1007/12_026.
- 28- Attia D. Review article of Nanocarriers Third Generation as Targeted Delivery Systems for Cancer Therapy. 2015. DOI: 10.13140/RG.2.1.1397.2320.
- 29- He B. Polymeric Micelle-Based Nanomedicine. En Zhao Y y Shen Y (Editores). *Biomedical Nanomaterials*. 2016. DOI: 10.1002/9783527694396.ch4.
- 30- Wu D, Si M, Xue HY, Wong HL. Nanomedicine applications in the treatment of breast cancer: current state of the art. *Int J Nanomedicine*. 2017. 12:5879–5892. DOI:10.2147/IJN.S123437.
- 31- Kim BYS, Rutka JT, Chan, CWC. Nanomedicine. *N Engl J Med*. 2010; 363:2434-2443.
- 32- Sivakumar PM, Kandasamy P, Chidambaram S, Venkatasubbu D, Perumal SK, Abimanyu S. Breast Cancer Targeted Treatment Strategies: Promising Nanocarrier Approaches. *Anticancer Agents Med Chem*. 2019. DOI: 10.2174/1871520619666191022175003.
- 33- Barenholz Y. Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J Control Release*. 2012. 160(2):117-134.
- 34- Jabir NR, Tabrez S, Ashraf GM, Shakil S, Damanhour GA, Kamal MA. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *Int J Nanomedicine*. 2012. 7:4391-4408.
- 35- Torchilin VP. Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*. 2007. 24(1):1-16.
- 36- Ahmad Z, Shah A, Siddiq M, Kraatz H-B. Polymeric micelles as drug delivery vehicles. *RSC Adv*. 2014. 4:17028-17038.
- 37- Shenoy DB, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified poly(-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int J Pharm*. 2005. 293: 261-270.

- 38- Chiappetta D, Sosnik A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007. 66:303-317.
- 39- Gonzalez-Lopez J, Alvarez-Lorenzo C, Taboada P, Sosnik A, Sandez-Macho I, Concheiro A. Self-associative behavior and drug-solubilizing ability of poloxamine (tetronic) block copolymers. *Langmuir.* 2008. 24(19):10688-10697.
- 40- Gaucher G, Dufresne M-H, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux J-C. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release.* 2005. 109: 169-188.
- 41- Cuestas ML, Glisoni RJ, Mathet VL, Sosnik A. Lactosylated poly(ethylene oxide)poly(propylene oxide) block copolymers for potential active targeting: Synthesis and physicochemical and self-aggregation characterization. *J Nanoparticle Res.* 2013. 15(1389): 1-21.
- 42- Glisoni RJ, Sosnik A. Novel Poly(Ethylene Oxide)- b -Poly(Propylene Oxide) Copolymer-Glucose Conjugate by the Microwave-Assisted Ring Opening of a Sugar Lactone. *Macromol Biosci.* 2014.14(11):1639-1651.
- 43- La SB, Okano T, Kataoka K. Preparation and characterization of the micelleforming polymeric drug indomethacin-incorporated poly(ethylene oxide)-poly(β benzyl L-aspartate) block copolymer micelles. *J Pharm Sci.* 1996. 85(1):85-90.
- 44- Glisoni RJ, Sosnik A. Encapsulation of the Antimicrobial and Immunomodulator Agent Nitazoxanide Within Polymeric Micelles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013. 13:1-13.
- 45- Domingues C, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Veiga F, Figueiras A. Nanotheranostic Pluronic-like polymeric micelles: shedding light into the dark shadows of tumors. *Mol Pharmaceutics.* 2019. Pág: 1-59 DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00945.
- 46- Salmaso S, Caliceti P. Stealth properties to improve therapeutic efficacy of drug nanocarriers. *J Drug Deliv.* 2013. 2013:1-19.
- 47- Alexis F, Pridgen EM, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy. *Handb Exp Pharmacol.* 2010. (197):55-86. doi: 10.1007/978-3-642-00477-3_2.

- 48- Kozlova D, Epple M. Biological targeting with nanoparticles: state of the art. *BioNanoMaterials*. 2013. 14(3-4):161-170.
- 49- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifepour Y. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013. 8(1):102.
- 50- Venmar KT, Kimmel DW, Cliffl DE, Fingleton B. IL4 receptor α mediates enhanced glucose and glutamine metabolism to support breast cancer growth. *Biochim Biophys Acta*. 2015. 1853(5):1219–1228. DOI:10.1016/j.bbamcr.2015.02.020.
- 51- Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001. 47:113-131.
- 52- Stapleton S, Allen C, Pintilie M, Jaffray D. Tumor perfusion imaging predicts the intra-tumoral accumulation of liposomes. *J Control Release*. 2013. 172:351-357.
- 53- Krupka TM, Exner AA. Structural parameters governing activity of Pluronic triblock copolymers in hyperthermia cancer therapy. *Int J Hyperthermia*. 2011. 27(7): 663–671. DOI:10.3109/02656736.2011.599828.
- 54- McMullen TP, Vilchèze C, McElhaney RN, Bittman R. Differential scanning calorimetric study of the effect of sterol side chain length and structure on dipalmitoylphosphatidylcholine thermotropic phase behavior. *Biophys J*. 1995. 69(1):169-76.
- 55- Feng R, Deng P, Zhou F, Feng S, Song Z. Pluronic F127-cyclodextrin conjugate micelles for encapsulation of honokiol. *J Nanoparticle Res*. 2018. 20(10):261-273. DOI:10.1007/s11051-018-4367-3.
- 56- Langer R, Folkman J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*. 1976. 263(5580):797-800.
- 57- Patidar, P., Pillai, S. A., Sheth, U., Bahadur, P., & Bahadur, A. Glucose triggered enhanced solubilisation, release and cytotoxicity of poorly water soluble anti-cancer drugs from T1307 micelles. *J Biotechnol*. 2017. 254: 43–50.
- 58- Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*. 1994. 263(5153):1600-1603.

- 59- Mahmud A, Xiong X-B, Aliabadi HM, Lavasanifar A. Polymeric micelles for drug targeting. *J Drug Target*. 2007. 15:553-584.
- 60- Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016. 235: 337–351.
- 61- Braun A. Validation of dynamic light scattering and centrifugal liquid sedimentation methods for nanoparticle characterisation. *Adv Powder Technol* 2011. 22:766–770.
- 62- Demetzos C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. *J Liposome Res*. 2008. 18(3):159-173.
- 63- Vanden-Hehir S, Tipping WJ, Lee M, Brunton VG, Williams A, Hulme AN. Raman Imaging of Nanocarriers for Drug Delivery. *Nanomaterials*. 2019. 9(3): 341. DOI:10.3390/nano9030341.
- 64- Rice SB, Chan C, Brown SC, et al. Particle size distributions by transmission electron microscopy: an interlaboratory comparison case study. *Metrologia*. 2013. 50(6):663–678. DOI:10.1088/0026-1394/50/6/663.
- 65- Couteau O, Roebben G. Measurement of the size of spherical nanoparticles by means of atomic force microscopy. *Meas Sci Technol*. 2011. 22(6):065101.
- 66- Li F, Snow-Davis C, Du C, Bondarev ML, Saulsbury MD, Heyliger SO. Preparation and Characterization of Lipophilic Doxorubicin Pro-drug Micelles. *J. Vis. Exp*. 2016. 114, e54338. doi:10.3791/54338
- 67- Dib N, Fernández L, Santo M. Formation of dendrimer-guest complexes as a strategy to increase the solubility of a phenazine N, N'-dioxide derivative with antitumor activity. *Heliyon*. 2019. 5(4): e01528. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01528.
- 68- Oddone N, Lecot N, Fernández M, et al. In vitro and in vivo uptake studies of PAMAM G4.5 dendrimers in breast cancer. *J Nanobiotechnology*. 2016. 14(1):45. DOI:10.1186/s12951-016-0197-6.
- 69- Carvalho KC, Cunha IW, Rocha RM, Ayala FR, Cajaíba MM, Begnami MD. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics*. 2011. 66(6):965-972.
- 70- Józwiak P, Lipińska A. [The role of glucose transporter 1 (GLUT1) in the diagnosis and therapy of tumors]. *Postepy Hig Med Dosw*. 2012. 66:165-174.

- 71- Yih TC, Al-Fandi M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *J Cell Biochem.* 2006. 97:1184-1190.
- 72- Sameera A, Erugula SR, Nellore VK, Sudhir MVS, Kumar AS, Pamidi VRC, Rajajee KTS, Ramakrishna BB. A review of literature on Targeted Drug Delivery Systems for the treatment of oropharyngeal cancer and strategies of targeting cancer. *IOSR J. Pharm. & Biol. Sci.* 2018. 13 (1) Ver. III: 22-28.
- 73- Xu W, Ling P, Zhang T. Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. *J Drug Deliv.* 2013. 2013: 340-315. DOI:10.1155/2013/340315. J
- 74- Brown, J. The Hypoxic Cell: A Target for Selective Cancer Therapy. *Cancer Res.* 1999. 59(23):5863–5870.
- 75- Denny W. Tumor activated prodrugs: a new approach to cancer therapy. *Cancer Invest.* 2004. 22(4): 604-619.
- 76- Overgaard J. Clinical evaluation of nitroimidazoles as modifiers of hypoxia in solid tumors. *Oncol Res.*1994. 6(10-11):509-518.
- 77- Brown J, Giaccia A. The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 2004: 58:1408-1416.
- 78- <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01395.x>.
Consultado: 17.08.19.
- 79- Lin AJ *et al.* Potential bioreductive alkylating agents. 1. Benzoquinone derivatives. *J Med Chem.* 1992. 15(12):1247-1256.
- 80- Cerecetto H, González M, Lavaggi ML. Development of hypoxia selective cytotoxins for cancer treatment: an update. *Med Chem.* 2006. 2(3):315-327.
- 81- Guise C.P., Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia. *Chinese J Cancer.* 2014. 33(2):80-86.
- 82- Graham K, Unger E. Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *Int J Nanomed.* 2018; 13:6049-6058.
- 83- Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J. Cell Biochem.* 2009; 107:1053-1062.
- 84- Phillips RM. Targeting the hypoxic fraction of tumors using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2016;77, 441-457.

- 85- Palos I, Rivera G. 1,4-Dióxido de quinoxalina; una opción viable para el desarrollo de fármacos antituberculosos. *Rev mex cienc farm.* 2015. 46 (2): 17-23.
- 86- Anderson RF, Yadav P, Patel D et al. Characterisation of radicals formed by the triazine 1,4-dioxide hypoxia-activated prodrug, SN30000. *Org Biomol Chem.* 2014. 12: 338-3392.
- 87- Monge A, Martínez-Crespo FJ, López de Ceráin A et al. Hypoxia-selective agents derived from 2-quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-N-oxides. 2. *J Med Chem.* 1995. 38: 4488-4494.
- 88- Ahmad S, Ahmad I. An insight into the therapeutic potential of quinazoline derivatives as anticancer agents. *Medchemcomm.* 2017. 8(5):871–885. DOI: 10.1039/c7md00097a.
- 89- Schofield PC, Robertson IGC, Paxton JW, McCrystal MR, Evans BD, Kestell P, Baguley BC. Metabolism of N²-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide in cancer patients undergoing a phase I clinical trial. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999. 44(1): 51-58. DOI: 10.1007/s002800050944.
- 90- Scherbakov AM, Borunov AM, Buravchenko GI et al. Novel quinoxaline-2-carbonitrile-1,4-dioxide derivatives suppress HIF1 α activity and circumvent MDR in cancer cells. *Cancer Invest.* 2018. 36: 199-209.
- 91- https://icono.fecyt.es/sites/default/files/filepublicaciones/2012_-_guia_de_desarrollos_preclinicospdf. Consultado: 10.08.2019.
- 92- Gil A, Magos Guerrero MLJ. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Rev Fac Med UNAM.* 2009. 52(66): 260-264.
- 93- Barreiro EJ. Química Medicinal / Química Médica, Simpósio de Integração Universitária à Indústria (ISIUIN).2012. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 94- Kerns EH, Di L. Drug-like properties: concepts, structure design and methods. 2008. Academic Press.
- 95- Sonzini B. Investigación y Desarrollo de los medicamentos, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2009.
- 96- OECD. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. 2008. <https://doi.org/10.1787/9789264071049-en>.

- 97- Kim HR, Lee JE, Jeong MH, Choi SJ, Lee K, Chung KH. Comparative evaluation of the mutagenicity and genotoxicity of smoke condensate derived from Korean cigarettes. *Environ Health Toxicol.* 2015. 30: e2015014. DOI:10.5620/eht.e2015014.
- 98- OECD. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. 1997. <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.
- 99- Cariello NF, Piegorsch WW. The Ames test: the two-fold rule revisited. *Mutat Res.* 1996. 369(1-2):23-31.
- 100- Chen J, Higby R, Tian D. Toxicological analysis of low nicotine and nicotine-free cigarettes. *Toxicology.* 2008. 249(2-3): 194–203. DOI:10.1016/j.tox.2008.05.009.
- 101- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., & Dusinska, M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology.* 2013; 8(3): 233–278. DOI:10.3109/17435390.2013.773464.
- 102- Bajaj G, Yeo Y. Drug Delivery Systems for Intraperitoneal Therapy. *Pharm Res.* 2010. 27(5): 735–738. doi:10.1007/s11095-009-0031-z.
- 103- Couto M, Alamón C, Sánchez C, Dávila B, Fernández M, Lecot N, Cabral P, Teixidor F, Viñas C, Cerecetto H. Carboranyl-anilinoquinazoline egfr-inhibitors: towards “lead-to-candidate” stage in the drug- development pipeline. *Future Med Chem.* 2019. 17:2273-2285. DOI: 10.4155/fmc-2019-0060.
- 104- Pulaski BA, Terman DS, Khan S, Muller E, Ostrand-Rosenberg S. Cooperativity of Staphylococcal aureus enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer Res.* 2000; 60(10): 2710-2715.
- 105- Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol.* 2001. 39(1): 20.2.1–20.2.16.
- 106- Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1992. 52(6):1399-405.
- 107- Kramer G, Masner M, Casales E, Moreno M, Smerdou C, Chabalgoity JA. Neoadjuvant administration of Semliki Forest virus expressing interleukin-12

combined with attenuated *Salmonella* eradicates breast cancer metastasis and achieves long-term survival in immunocompetent mice. *BMC Cancer*. 2015. 15: 620. DOI:10.1186/s12885-015-1618-x.

- 108- Zuñiga JM, Orellana JM, Tur JA. *Ciencia y tecnología del animal de laboratorio*. Madrid. 2008.
- 109- Fernandez S, Berchesi A, Tejeria E, Sanz I, Cerecetto H, Gonzalez M, Lavaggi ML, Rey A. Preparation and Biological Evaluation of ^{99m}Tc-Labelled Phenazine Dioxides as Potential Tracers for Hypoxia Imaging. *Curr Radiopharm*. 2015. 8(1):56-61. DOI:10.2174/1874471007666141202145948.
- 110- Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and targetspecific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008. 60(12):1347-1370.
- 111- Dewanjee MK. The chemistry of ^{99m}Tc-labeled radiopharmaceuticals. *Semin Nucl Med*. 1990. 20(1):5-27.
- 112- Decristoforo C, Dennen S. *The Radiopharmacy*. European Association of Nuclear Medicine. Vienna, Austria. 2012.
- 113- Banerjee S, Pillai MR, Ramamoorthy N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Semin Nucl Med*. 2001. 31(4):260-277.
- 114- Arteaga C, Ferro-Flores G. *Compuestos de Tecnecio*. México: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán: Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. 2003. 1-131.
- 115- https://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/trs466_web.pdf. Consultado: 10.08.2019.
- 116- Oda CMR, Fernandes RS, de Araújo Lopes SC, et al. Synthesis, characterization and radiolabeling of polymeric nano-micelles as a platform for tumor delivering. *Biomed Pharmacother*. 2017. 89:268–275. DOI:10.1016/j.biopha.2017.01.144.
- 117- Isaac-Olivé K, Ocampo-García BE, Aranda-Lara L, Santos- Cuevas CL, Jiménez-Mancilla NP, Luna-Gutiérrez MA, Medina LA, Nagarajan B, Sabnis N, Raut S, Prokai L, Lacko AG. [^{99m}Tc-HYNIC-N-dodecylamide]: a new hydrophobic tracer for labelling reconstituted high-density lipoproteins (rHDL) for radioimaging. *Nanoscale*. 2019. 11: 541-551. DOI:10.1039/C8NR07484D.

- 118- Iyer AK, He J, Amiji MM. Image-guided nanosystems for targeted delivery in cancer therapy. *Curr Med Chem*. 2012. 19(19):3230–3240.
- 119- Urquiola C, Vieites M, Torre MH et al. Cytotoxic palladium complexes of bioreductive quinoxaline N1,N4-dioxide prodrugs. *Bioorg Med Chem*. 2009. 17 : 1623-1629.
- 120- Ortega MA, Morancho MJ, Martínez-Crespo FJ et al. New quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-N-oxide derivatives as hypoxic-cytotoxic agents. *Eur J Med Chem*. 2000. 35: 21-30.
- 121- Gonda M, Nieves M, Nunes E et al. Phenazine N,N'-dioxide scaffold as selective hypoxic cytotoxin pharmacophore. Structural modifications looking for further DNA topoisomerase II-inhibition activity. *Med Chem Commun* 2013. 4: 595-607.
- 122- Cunha JD, Lavaggi ML, Abasolo MI, Cerecetto H, González M. 2D- and 3D- quantitative structure-activity relationship studies for a series of phenazine N,N'-dioxide as antitumour agents. *Chem Biol Drug Des*. 2011. 78: 960-968.
- 123- Lavaggi ML, Cabrera M, Aravena MA et al. Study of benzo[a]phenazine 7,12-dioxide as selective hypoxic cytotoxin-scaffold. Identification of aerobic-antitumoral activity through DNA fragmentation. *Bioorg Med Chem*. 2010. 18: 4433-4440.
- 124- Cerecetto H, González M, Lavaggi ML, Azqueta A, López de Cerain A, Monge A. Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins. *J Med Chem*. 2005. 48: 21-23.
- 125- Ghattass K, El-Sitt S, Zibara K et al. The quinoxaline di-N-oxide DCQ blocks breast cancer metastasis in vitro and in vivo by targeting the hypoxia inducible factor-1 pathway. *Mol Cancer*. 2014; 13, 12.
- 126- Gali-Muhtasib H, Sidani M, Geara F et al. Quinoxaline 1,4-dioxides are novel angiogenesis inhibitors that potentiate antitumor effects of ionizing radiation. *Int J Oncol*. 2004; 24: 1121-1131.
- 127- Lavaggi ML, Nieves M, Cabrera M et al. Structural modifications on the phenazine N,N'-dioxide-scaffold looking for new selective hypoxic cytotoxins. *Eur J Med Chem*. 2010. 45: 5362-5369.
- 128- Lavaggi ML, Cabrera M, Pintos C et al. Novel phenazine 5,10-dioxides release •OH in simulated hypoxia and induce reduction of tumor volume in vivo. *ISRN Pharmacol*. 2011.

- 129- Cerecetto H, González M, Lavaggi ML, Porcal W. Preparation of phenazine N5,N10-dioxides. Effects of benzofuroxan substituents in the outcome of their expansion reaction with phenolates. *J Braz Chem Soc.* 2005. 16: 1290-1296.
- 130- Dávila B, Sánchez C, Fernández M, Cerecetto H, Lecot N, Cabral P, Glisoni R, González M. Selective hypoxia-cytotoxin 7-fluoro-2-aminophenazine 5,10-dioxide: toward "candidate-to-drug" stage in the drug-development pipeline. *ChemistrySelect.* 2019. 4(32): 9396-9402. DOI:10.1002/slct.201902601.
- 131- Bashi AM, Haddawi SM, Mezaal MA. Layered double hydroxides nanohybrid intercalation with folic acid used as delivery system and their controlled release properties. *Arab J Sci Eng.* 2012. 38(7): 1663–1680. DOI:10.1007/s13369-012-0403-2.
- 132- Duan K, Zhang X, Tang X, Yu J, Liu S, Wang D, Li Y, Huang J. Fabrication of cationic nanomicelle from chitosan-graft-polycaprolactone as the carrier of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010. 76(2): 475–482. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.12.007
- 133- Rezaei A, Varshosaz J, Fesharaki M, Farhang A, Jafari SM. Improving the solubility and in vitro cytotoxicity (anticancer activity) of ferulic acid by loading it into cyclodextrin nanosponges. *Int J Nanomedicine.* 2019. 14: 4589-4599. DOI: 10.2147/IJN.S206350.
- 134- Glisoni RJ, García-Fernández MJ, Pino M, Gutkind G, Moglioni AG, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Sosnik A. Cyclodextrin hydrogels for the ocular release of antibacterial thiosemicarbazones. *Carbohydr Polym.* 2013; 93: 449–457.
- 135- Seremeta KP, Chiappetta DA, Sosnik A. Poly(ϵ -caprolactone), Eudragit[®] RS 100 and poly(ϵ -caprolactone)/Eudragit[®] RS 100 blend submicron particles for the sustained release of the antiretroviral efavirenz. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013. 102: 441-449. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.06.038.
- 136- Sanna V, Roggio AM, Posadino AM, et al. Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on poly(lactide-co-caprolactone) and poly(lactide-co-glycolide-co-caprolactone) for prostate cancer treatment: formulation, characterization, and cytotoxicity studies. *Nanoscale Res Lett.* 2011. 6(1): 260. DOI:10.1186/1556-276X-6-260

- 137- Clift MJ, Raemy DO, Endes C, Ali Z, Lehmann AD, Brandenberger C, Petri-Fink A, Wick P, Parak WJ, Gehr P, Schins RP, Rothen-Rutishauser B. Can the Ames test provide an insight into nano-object mutagenicity? Investigating the interaction between nano-objects and bacteria. *Nanotoxicology*. 2012. 7(8):1373–1385. DOI:10.3109/17435390.2012.741725.
- 138- Alexander JF, Aguirre-Villarreal D, Godin B. Liposomal encapsulation masks genotoxicity of a chemotherapeutic agent in regulatory toxicology assessments. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017.13(3): 829-833. DOI: 10.1016/j.nano.2016.12.016
- 139- Cariello NF, Piegorsch WW. The Ames test: the two-fold rule revisited. *Mutat Res*. 1996. 369(1-2): 23-31.
- 140- OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. 2002. <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>.
- 141- Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*. 1968; 13, 222-257. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00401402>
- 142- Gad SC. Rodents model for toxicity testing and biomarkers. En: Gupta R (Editor). *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press. 2014. (2) 7-69. DOI:10.1016/B978-0-12-404630-6.00002-6.
- 143- Deora Paramveer S., Mishra Chanchal K., Mavani Paresh, Asha Rani and Shrivastava B, Rajesh Kumar Nema. Effective alternative methods of LD50 help to save number of experimental animals. *J Chem Pharm Res*. 2010; 2(6):450-453.
- 144- Roux S, Sablé E, Porsolt RD. Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function. *Curr Protoc Pharmacol*. 2005. 27(1): 10.10.1-10.10.23. DOI: 10.1002/0471141755.ph1010s27.
- 145- L.C. Bailey-Downs, J.E. Thorpe, B.C. Disch, et al., Development and characterization of a preclinical model of breast cancer lung micrometastatic to macrometastatic progression. *PLoS One*. 2014. 9(5): e98624.

- 146- Chiang PC, Gould S, Nannini M, et al. Nanosuspension delivery of paclitaxel to xenograft mice can alter drug disposition and anti-tumor activity. *Nanoscale Res Lett.* 2014. 9(1):156. DOI: 10.1186/1556-276X-9-156.
- 147- Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Van De Vorstenbosch C. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol.* 2001. 21(1): 15-23.
- 148- Mortom DB, Jennings M, Beckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgayte B, Inglis I, James R, Page C, Sharman I, Verschoyle R, Westall L, Wilson AB. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAWF/ FRAME/ RSPCA/ UFAW joint working group on refinement. *Lab Anim.* 2001; 35(1): 1-41.
- 149- Working with the Laboratory Mouse. American Association for Laboratory Animal Science. <http://www.aalas.org>. Consultado: 10.08.2019.
- 150- <http://labanimals.stanford.edu/Guidelines>. Consultado: 10.08.2019.
- 151- Danneman PJ, Suckow MA, Brayton C. *The Laboratory Mouse*. 2nd Edition. CRC Press. 2012.
- 152- http://www.user.cnb.csic.es/~animalario/CEEA/CEEA_Tecnicas61_2.doc
Consultado: 19.07.2019.
- 153- <http://sea.umh.es/files/2011/07/Refinamiento-administraci%C3%B3n-sustancias.pdf> . Consultado: 5.08.2019
- 154- <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/breeding-and-husbandry-support/mouse-room-conditions>. Consultado: 5.08.19.
- 155- http://animalab.eu/sites/all/pliki/produkty-dopobrania/balb_c_Mouse_clinical_pathology_data.pdf. Consultado: 19.07.2019.
- 156- http://jackson.jax.org/rs/444-BUH-304/images/physiological_data_000651.pdf. Consultado: 19.07.2019.
- 157- Kamboj S, Saini V, Bala S. Formulation and characterization of drug loaded nonionic surfactant vesicles (niosomes) for oral bioavailability enhancement. *Sci World J.* 2014. 2014: 95974. DOI:10.1155/2014/959741.
- 158- Kaplan, E. L. y Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observation. *Journal of the American Statistical Association.* 53(282): 457-481. DOI: 10.1080/01621459.1958.10501452.

- 159- Hosmer, D. Lemeshow, S. May, S. "Applied Survival analysis: Regression modeling of time-to-event data (2nd ed.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. (2008)
- 160- Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011. 63(3):136-51. DOI:10.1016/j.addr.2010.04.009
- 161- Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011. 63(3):131-5. DOI: 10.1016/j.addr.2010.03.011
- 162- Bukchin A, Kuplennik N, Carcaboso AM, Sosnik A. Effect of growing glycosylation extents on the self-assembly and active targeting in vitro of branched poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymers. *Appl Mater Today.* 2018. 11: 57–69. DOI: 10.1016/j.apmt.2018.01.003
- 163- Ioannidis JPA, Kim BYS, Trounson A. How to design preclinical studies in nanomedicine and cell therapy to maximize the prospects of clinical translation. *Nat Biomed Eng.* 2018. 2(11):797–809. DOI:10.1038/s41551-018-0314-y.
- 164- Anjum R, Malik A. Mutagenicity assessment of contaminated soil in the vicinity of industrial area. *Environ Monit Assess.* 2012. 184: 3013-3026. DOI: 10.1007/s10661-011-2167-7
- 165- Gao JL, Shui YM, Jiang W, et al. Hypoxia pathway and hypoxia-mediated extensive extramedullary hematopoiesis are involved in ursolic acid's anti-metastatic effect in 4T1 tumor bearing mice. *Oncotarget.* 2016. 7(44):71802–71816. DOI:10.18632/oncotarget.12375.
- 166- Carreño RE, Rodríguez MJA, Santana Martínez S, de la Cruz Merino L. Toxicidad hepática en paciente con cáncer de mama metastático HER-2(+) en tratamiento con capecitabina y lapatinib. *Farm Hosp.* 2016. 40(2): 134-136. DOI: 10.7399/fh.2016.40.2.9360
- 167- Varma MV, Feng B, Obach RS et al. Physicochemical determinants of human renal clearance. *J Med Chem.* 2009. 52:4844-4852. DOI: 10.1021/jm900403j.